

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2005年9月22日 (22.09.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/087269 A1

- (51)国際特許分類⁷: A61K 45/00, 31/7105, 35/76, 48/00, A61P 35/00
- (21)国際出願番号: PCT/JP2005/004485
- (22)国際出願日: 2005年3月15日 (15.03.2005)
- (25)国際出願の言語: 日本語
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:
特願2004-074570 2004年3月16日 (16.03.2004) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒3050856 茨城県つくば市観音台1丁目25番1号 Ibaraki (JP).
- (72)発明者; および
- (75)発明者/出願人(米国についてのみ): 居石 克夫 (SUEISHI, Katsuo) [JP/JP]; 〒8150073 福岡県福岡市南区大池1-29-22 Fukuoka (JP). 米満 吉和 (YONEMITSU, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒8130043 福岡県福岡市東区名島5-3 1-3 Fukuoka (JP). 鹿田 康紀 (SHIKADA, Yasunori) [JP/JP]; 〒8110212 福岡県福岡市東区美和台5-1-25-1 O1 Fukuoka (JP). 堤 敬文 (TSUTSUMI, Norifumi) [JP/JP]; 〒8140032 福岡県福岡市早良区小田部6-1-22-2 O7 Fukuoka (JP). 長谷川 譲 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒3050856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP).
- (74)代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- すべての指定国そのための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54)Title: METHOD OF INHIBITING TUMOR PROLIFERATION

A1

(54)発明の名称: 腫瘍増殖を抑制する方法

WO 2005/087269

(57)Abstract: It is intended to provide a method of inhibiting tumor proliferation which comprises the step of inhibiting the expression of PDGF-A or the binding of PDGF-A homodimer to PDGFR α . Activation of the PDGFR α -p70S6K signal transfer pathway by PDGF-AA, which is an important factor in tumor angiogenesis, relates to the prognosis of a patient suffering from tumor. By inhibiting the expression of PDGF-A in a tumor or a tissue around it or by inhibiting the binding of PDGF-A homodimer to PDGFR α , angiogenesis in the tumor and retention of the blood vessels can be inhibited and thus the tumor proliferation can be inhibited.

(57)要約: 本発明は、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する工程を含む、腫瘍増殖を抑制する方法を提供する。PDGF-AAによるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の活性化は、腫瘍血管形成の重要なファクターであり腫瘍を患う患者の予後と関連している。腫瘍またはその周辺組織におけるPDGF-Aの発現を阻害することによって、あるいはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害することによって、腫瘍における血管系の形成および維持を阻害し、これにより腫瘍の増殖を抑制することができる。

明細書

腫瘍増殖を抑制する方法

技術分野

[0001] 本発明は、腫瘍増殖を抑制する方法に関する。

背景技術

[0002] 抗血管新生薬による腫瘍増殖の低下を示す多くの動物実験により、腫瘍の拡大には血管新生を必要とすることが示されている (Folkman J., N Engl J Med 1971;285:1182–1186; Holmgren L. et al., Nat Med. 1995;1:149–153; Hlatky L et al., J Natl Cancer Inst. 2002;94:883–893)。血管内皮増殖因子 (VEGF) は腫瘍の血管新生の鍵となるメディエーターであり、可溶性の高親和性受容体であるfms-likeチロシンキナーゼ-1 (FLT-1) の過剰発現によるVEGF活性の阻害は、腫瘍の休眠を誘導する (Goldman CK et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1988;95:8795–8800; Kuo CJ et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:4605–4610)。これらの研究は、VEGFに関連するシグナル伝達が腫瘍の血管新生の標的となり得ることを示唆する。しかしながら、これらとは別の研究では、FLT-1の抗腫瘍効果は、調べた各腫瘍型のVEGF発現レベルに高度に依存していることが報告されており (Takayama K et al., Cancer Res. 2000;60:2169–2177)、抗VEGFによる治療戦略はごく限られたものになることが示唆される。従って広範囲に作用する抗腫瘍薬の開発にとって、各腫瘍型における血管新生増殖因子の発現プロフィールによらない、共通した腫瘍血管新生の分子標的を見つけ出すことが必要である。

非特許文献1:Folkman J., N Engl J Med 1971;285:1182–1186

非特許文献2:Holmgren L. et al., Nat Med. 1995;1:149–153

非特許文献3:Hlatky L et al., J Natl Cancer Inst. 2002;94:883–893

非特許文献4:Goldman CK et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1988;95:8795–8800

非特許文献5:Kuo CJ et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:4605–4610

非特許文献6:Takayama K et al., Cancer Res. 2000;60:2169–2177

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0003] 本発明は、腫瘍における血管系の形成および維持を阻害し、それにより腫瘍の増殖を抑制する方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0004] 最近の研究により開発された新たな免疫抑制薬であるラパマイシン (RAPA) は抗血管新生作用を持っており、腫瘍を縮退させることができている (Guba M et al., Nat Med. 2002;8:128–135)。臓器移植後の患者の免疫抑制治療は、腫瘍の発生および再発のリスクを増大させるが、RAPAの使用は、悪性腫瘍の発生の機会を減少させると考えられてきた。培養細胞のデータから、RAPAの抗血管新生効果は、腫瘍からのVEGF発現の減少が関与することが示唆されているが、インビボにおける正確な作用機構は不明である。

[0005] これとは別に、本発明者らは最近、重症肢虚血の治療のための線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) を用いた治療的血管新生において、内皮細胞 (endothelial cell; EC) ではなく間葉系細胞 (mesenchymal cell; MC) における血管新生に関与するポリペプチドの発現が必須の役割を果たすことを実証している (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966–973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723–730)。FGF-2は、血管系の間葉系細胞 (MCs; 周皮細胞 (pericyte)、血管平滑筋細胞、および外膜線維芽細胞 (adventitial fibroblasts)を含む) におけるVEGFおよび別の血管新生因子である肝細胞増殖因子/scatter因子 (hepatocyte growth factor/scatter factor) (HGF/SF) の局所的発現を刺激する (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723–730)。興味深いことに、FGF-2を介したHGF/SF発現の時間経過は二相的 (bi-phasic) で、初期のアップレギュレーションは新規の蛋白質合成を必要としないが、後期のアップレギュレーションは内在性の胎盤由来増殖因子受容体α (platelet-derived growth factor receptor- α ; PDGFR α)—p70S6キナーゼ経路により媒介・維持される (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723–730)。

[0006] 肿瘍の拡大には、VEGFだけでなく宿主由来のFGF-2の活性が関わっている (Compagni A et al., Cancer Res. 2000;60:7163–7169) と予想され、またRAPAはTOR (target of rapamycin) の活性を低下させることを介したp70S6Kの特異的阻害剤

であることから、本発明者らは、RAPAによる抗腫瘍効果は、宿主に由来するストローマMCにおけるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路が関与しており、各々の腫瘍からの様々な血管新生シグナルには影響されないと予想した。

- [0007] 実際、腫瘍フリーのマウス（すわなちマウスの肢虚血）を用いた実験の結果、本発明者らは、p70S6K阻害剤ラパマイシン（RAPA）が、間葉系細胞を標的として、PDGFR α -p70S6K経路のサイレンシングにより血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）および肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor; HGF）の持続的発現を遮断することを証明した（実施例2）。また、腫瘍を用いた評価においては、調べた各腫瘍における血管新生因子の発現プロファイルが多様であることは無関係に、たとえ腫瘍でVEGFの発現が亢進している場合であっても、一定してRAPAは腫瘍を休眠（dormancy）させ、時間経過と共に重度の虚血状態に導いた（実施例4）。RAPAは、培養系においては、低酸素（hypoxia）に関連するVEGFの発現に対して最小限の影響しか示さないことから、これらの結果はRAPAはインビボにおいて、腫瘍そのものというよりも宿主の血管系（host-vasculature）を標的としていることが示唆された。すなわち本発明は、PDGFR α -p70S6K経路は、FGF-2を介した治療的新血管形成に必須の調節ファクターであるのみならず、腫瘍の血管新生における宿主由来の血管系の必須の調節ファクターであり、複数の血管増殖因子の発現を制御していることを示した。このように本発明は、間葉系細胞におけるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路は、悪性腫瘍の性質によらずに血管新生を阻害することができる、共通でユビキタスな分子標的となることを証明した。
- [0008] PDGFR α の生物学的役割は長い期間議論のあるものであった。PDGF-Aホモダイマー（PDGF-AA）はDNA合成を誘導しNIH3T3細胞の増殖も誘導する。しかし反対に、他の細胞では、他の試薬により誘導されたケモタキシス反応を阻害する（Siegbahn A et al., J Clin Invest. 1990;85:916-920）。PDGF受容体の内皮細胞における発現についてはほとんど証拠がないが、PDGF受容体リガンドは、PDGF-AAおよびPDGF-BBだけでなく、新規のPDGFであるPDGF-CC（Li X et al., Nat Cell Biol. 2000;2:302-309）もまた、インビボで血管新生を刺激する（Nicosia RF et al., Am J Pathol. 1994;145:1023-1029; Cao R et al., FASEB J. 2002;16:1575-1583）。これらの

ことは、他の血管新生の刺激因子もPDGF依存的血管新生の過程を媒介している可能性を示唆している。本発明は、以前の研究 (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730) と同様に、MCにおけるVEGFおよびHGF/SFを用いた血管新生シグナルの維持に、PDGFR α 系が必須であることを示唆する。しかしながら、これらのリガンドは全てPDGFR α を活性化し、それぞれ異なる細胞応答を引き起こすことができるため、血管新生において必須のリガンドを決定できなかった。本発明において、PDGFR α リガンド中でも、特にPDGF-Aが腫瘍血管系の形成に重要な役割を果たしていることが示された。PDGF-Aの発現の亢進は、腫瘍の悪性度と密接に関連しており、腫瘍細胞におけるPDGF-Aの発現を阻害することによって、腫瘍の増殖は劇的に抑制された(実施例5)。このように、PDGF-Aの発現を抑制、あるいはPDGF-AAとPDGFR α との結合を阻害することによって、腫瘍における血管系形成を効果的に抑制し、腫瘍を休眠に導くことができる事が明らかとなった。

[0009] 例えば、PDGF-Aの発現を阻害するsiRNAまたはsiRNAを発現するベクターを腫瘍に投与することによって、あるいは、可溶性PDGFR α またはPDGF-A抗体、またはそれらを発現するベクターを腫瘍に投与することによって、腫瘍における宿主血管系の形成および維持を阻害し、腫瘍の増殖を抑制、さらには虚血に導き、腫瘍を縮退させることができる。このような治療は腫瘍血管系におけるPDGFR α -p70S6キナーゼシグナル伝達を特異的に阻害することができるため、優れた治療効果を示し、かつ副作用が少ない。本発明の方法は、非常に効果的に腫瘍休眠を誘導できる新たな抗腫瘍治疗方法として極めて有用である。

[0010] すなわち本発明は、腫瘍の増殖を抑制する方法に関し、より具体的には、請求項の各項に記載の発明に関する。なお同一の請求項を引用する請求項に記載の発明の1つまたは複数の組み合わせからなる発明は、それらの請求項に記載の発現に既に意図されている。すなわち本発明は、

[1]PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する工程を含む、腫瘍の増殖を抑制する方法、

[2]該工程が、PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質をコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを腫瘍に投与する工程である、[1]に記載

の方法、

[3]該ベクターが投与された細胞を投与する、[2]に記載の方法、

[4]細胞が樹状細胞である、[3]に記載の方法、

[5]該分泌性蛋白質が可溶性PDGFR α である、[2]から[4]のいずれかに記載の方法、

[6]マイナス鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、[2]から[5]のいずれかに記載の方法、

[7]該工程が、PDGF-A遺伝子のアンチセンスRNA、siRNA、あるいは該アンチセンスRNAまたはsiRNAをコードするベクターを腫瘍に投与する工程である、[1]に記載の方法、

[8]腫瘍が扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、および腺癌からなる群より選択される、[1]から[7]のいずれかに記載の方法、

[9]PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する化合物を有効成分として含む抗腫瘍剤、

[10]下記(a)から(d)のいずれかを含む、[9]に記載の抗腫瘍剤、

(a) PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質、

(b) PDGF-A遺伝子またはPDGFR α 遺伝子のアンチセンスRNA、

(c) PDGF-A遺伝子またはPDGFR α 遺伝子のsiRNA、

(d) (a)から(c)のいずれかをコードするベクター、

[11]PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質をコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを含む、[10]に記載の抗腫瘍剤、

[12]該分泌性蛋白質が可溶性PDGFR α である、[10]または[11]に記載の抗腫瘍剤、

[13]マイナス鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、[11]に記載の抗腫瘍剤、

[14]PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質をコードするベクターが導入された細胞を含む、[10]から[13]のいずれかに記載の抗腫瘍剤、

[15]細胞が樹状細胞である、[14]に記載の抗腫瘍剤、

[16]PDGF-A遺伝子のアンチセンスRNA、siRNA、あるいは該アンチセンスRNAまたはsiRNAをコードするベクターを有効成分として含む、[10]に記載の抗腫瘍剤、

[17]腫瘍が扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、および腺癌からなる群より選択される、[9]から[16]のいずれかに記載の抗腫瘍剤、に関する。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1]VEGF発現のアップレギュレーションにおけるFGF-2およびPDGF-AAの作用機構の解析結果を示す図である。 (A) 組み換えFGF-2およびPDGF-AAは協同して線維芽細胞 (MRC5) および血管平滑筋細胞 (HSMC) からのVEGF分泌を増加させる。血清不含条件下で48時間プレインキュベーションした後、各細胞型をFGF-2および/またはPDGF-AAで刺激した。72時間後、培養液をELISAに供した。各群 n=3。* P<0.01。# P<0.05。 (B) MRC5細胞およびHSMCにおけるFGF-2を介したPDGFR α mRNA発現のタイムコースのノーザンプロット解析。血清不含条件下で48時間プレインキュベーションした後、各細胞型をFGF-2で刺激した。図示した時間に細胞を回収し、ノーザンプロット解析に供した。バンドを可視化し、フォトイメージャーを用いたデンシトメリー解析に供した。2回実験を行い類似の結果を得た。
- [図2]PDGFR α -p70S6Kは、間葉系細胞におけるFGF-2を介したVEGF/HGFの持続的/2相的発現に必須であることを示す図である。 (A) MRC5細胞のVEGFおよびHGF分泌に及ぼす、細胞内シグナル伝達経路の種々の阻害剤の効果。1%FBS存在下で48時間プレインキュベーションした後、種々の阻害剤の存在下または非存在下で、10 ng/mlのヒト組み換えFGF-2で細胞を刺激した。72時間後、培地をELISAに供した。各群 n=3。* P<0.01。 (B) p70S6K阻害剤であるラパマイシン (RAPA) は、MRC5細胞のFGF-2を介したVEGF mRNA発現の後期フェーズを止める。1%FBS存在下で48時間プレインキュベーションした後、10 ng/mlのヒト組み換えFGF-2で細胞を刺激した。図示した時間で細胞を回収し、ノーザンプロット解析を行った。バンドを可視化し、フォトイメージャーを用いたデンシトメリー解析に供した。グラフは、トリプリケートの実験の結果を反映したVEGFの相対mRNAレベルの定量結果を示す。* P<0.01。 (C) FGF-2を介したVEGF分泌の上昇は完全にPDGFR α に依存する。1% FBS存在下で48時間プレインキュベーションした後、抗PDGFR α 中和抗体の存在下

または非存在下で、MRC5細胞を10 ng/mlのヒト組み換えFGF-2で刺激した。72時間後、培地をELISAに供した。HGF発現についても類似の結果を得た（データ非提示）。* P<0.01。

[図3]PDGFR α 系により媒介されるVEGFおよびHGFのアップレギュレーションは、マウス重症肢虚血におけるFGF-2遺伝子導入の治療効果に必須であることを示す図である。* P<0.01。# P<0.05。（AおよびB）FGF-2遺伝子導入を行った場合と行わない場合のC57BL6救肢モデルマウスにおける虚血大腿筋でのPDGF-A（上パネル）およびPDGFR α （下パネル）mRNA相対発現の時間経過。肢虚血誘導術の直後に、SeV-mFGF2 (10^7 plaque forming units: pfu) を筋肉内注射した。各時間に、大腿筋サンプルを調製しリアルタイムPCRに供した。データはGAPDH mRNAの各レベルで標準化し、未治療コントロールマウスから得た結果の相対発現で示した。各群はマウス4個体を含む。各時間で、コントロールウイルスベクター（SeV-luciferase）を注入した虚血マウス1または2個体をコントロールマウスとしたが、これらのマウスは肢虚血を起こしたマウスで見られた結果と同様の結果を示した（データ非提示）。（CおよびD）FGF-2遺伝子導入に続き、抗PDGF-AA中和抗体（プロトコルは図4の説明を参照）またはRAPA (1.5 mg/kg/day、毎日腹腔内注入) で処理したC57BL6救肢モデルマウスにおける虚血大腿筋でのVEGF（上パネル）およびHGF（下パネル）mRNA相対発現の時間経過。図3Aの虚血群、および虚血+FGF-2群と同じ組織サンプルを用いた。各時間で、コントロールウイルスベクター（SeV-luciferase）を注入した虚血マウス1または2個体をコントロールマウスとしたが、虚血のみを起こしたマウスで見られた結果と同様の結果を示した（データ非提示）。（EおよびF）RAPAは、マウス肢虚血救肢モデルにおけるFGF-2を介したVEGF（パネルE）およびHGF（パネルF）蛋白質の発現を阻害する。day 0の前日からRAPA (1.5 mg/kg/day、毎日) 腹腔注入を開始し、day 0で虚血術を実施した。その時に、 10^7 pfu のコントロールウイルス（SeV-liciferase）またはSeV-mFGF2を筋肉内注入した。2日後、大腿筋をELISAに供した。FGF-2遺伝子導入を介して誘導された外来性FGF-2発現は、RAPAで処理したマウスとしないマウスで違いは見られなかった（データ非提示）。

[図4]肢虚血を起こしたbalb/c nu/nuマウス（肢脱落モデル）において、抗PDGF-AA

中和抗体は、RAPAと同様に、FGF-2遺伝子導入の効果を失わせることを示す図である。肢の予後を12の救肢スコアにより決定し、データをlog-rank testで解析した。抗PDGF-AA中和抗体を、ディスポーザブルの浸透圧ポンプの移入を介した腹腔への連続放出 ($200 \mu\text{g}/7\text{日}$) により投与した。手術による虚血誘導の直後にも、附加的に腹腔内へのボーラス注入 ($100 \mu\text{g}$) を行った。

[図5]腫瘍増殖におけるRAPA処理および可溶性PDGFR α 発現の効果を示す図である。各腫瘍型細胞 10^6 細胞を皮下移植して7日後に、RAPA (15 mg/kg/day) または 0.1 mol/L のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の腹腔内注入を毎日、あるいは SeV-luciferase または SeV-hsPDGFR α (1×10^8 pfu/tumor) の腫瘍内注入を1回行った。* P<0.01。# P<0.05。 (A～D) SAS (ヒト口腔由来、口腔扁平上皮細胞癌) および MH134 (マウス肝細胞癌) におけるPDGF-AAを含む血管新生増殖因子のインビトロ発現パターン、およびRAPAの腫瘍抑制効果。データは、3つの独立した実験の結果を含み、それぞれの実験では2-4個体のマウスを用いた。Day 28に全体的な観察像を撮影した。矢印は腫瘍を示す。 (EおよびF) ヒトPDGFR α の細胞外ドメインを発現する組み換えSeVのSASおよびMH134に対する抗腫瘍効果。細胞移植の5日後にベクター溶液 $50 \mu\text{L}$ を腫瘍内注入した。ルシフェラーゼを発現する組み換えSeVをコントロールとして用いた。

[図6]腫瘍増殖におけるインビボおよびインビトロでの血管新生増殖因子の発現に及ぼすRAPA処理の効果を示す図である。MH134 (A～C) およびSAS (D) における腫瘍血流と血管新生増殖因子との関係を示す。 (A) および (B) インビボにおける腫瘍内血流のRAPAによる減少 (B: パネルおよびグラフ) およびマウスVEGFの比較的高い発現パターン (A)。同系 (syngenic) の腫瘍 (MH134、アスタリスク) を持つマウスへのRAPAの注入の開始から7日後に、ドップラー環流像を記録し、腫瘍サンプルをELISAに供した。Day 3の腫瘍も独立に蛋白質測定に供した (A: day 3、各群n=4)。day 7では、腫瘍のサイズは互いに有意差はなかった (B:アスタリスク)。 (C) hypoxia が誘導するMH134細胞のVEGF発現に対するRAPAの効果は有意であるが最小限であることを示す棒グラフ。血清不含の条件で12時間培養後、新しい培地で細胞を洗い、normoxia ($21\% \text{O}_2$) または hypoxia ($2.5\% \text{O}_2$) の状態に暴露した。48時間後、培地

をELISAに供しマウスVEGFを測定した。 (D) ヒト腫瘍型 (SAS) を担持するマウスの血管新生増殖因子の発現におけるRAPAに関連する変化。アップレギュレートされたVEGFの起源を調べるために観察した。SAS担持マウスへのRAPA注入開始の7日後、腫瘍サンプルをヒトおよびマウスVEGF特異的ELISA系に供した。

[図7]外来的VEGF165遺伝子からのVEGF165発現に及ぼすアンチセンスヒトPDGF-A遺伝子導入の効果を示す図である。

[図8]腫瘍細胞からの内在性VEGF165の発現に及ぼすアンチセンスヒトPDGF-A遺伝子導入の効果を示す図である。

[図9]PDGF-Aの発現を阻害した腫瘍細胞のin vivo増殖能の低下を示す図である。

[図10]ヒト肺癌手術新鮮標本における、PDGF-AとVEGFのmRNA発現の相関を示す図である。

[図11]ヒト肺癌切除標本におけるPDGF-AA陽性率と患者予後の相関を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0012] 本発明は、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する工程を含む、腫瘍の増殖を抑制する方法に関する。PDGFR α は、PDGF-A、-B、-C等のPDGFファミリーのヘテロまたはホモダイマーの受容体であり細胞内チロシンキナーゼを活性化し自身および他の下流分子のリン酸化を誘導する (Claesson-Welsh, L. (1994) Prog. Growth Factor Res. 5:37)。PDGFR α の活性化は、p70S6キナーゼ (p70S6K) を介して腫瘍における血管新生を誘導する。p70S6キナーゼはmRNAの翻訳にかかわるエフェクター分子であり、PI-kinase-related kinase (PIK-RK) ファミリー蛋白質の1つであるmTORによる制御を受けている。本発明において、間葉系細胞のPDGFR α シグナル伝達経路は、損傷等による虚血における血管再生のみならず、腫瘍の血管新生にも本質的な役割を果たしていることが判明した。さらに、腫瘍血管新生においてPDGFR α シグナル伝達経路は、各腫瘍型における血管新生物質の発現パターンの多様性によらず必須であることが判明した。このように、宿主由来の血管系におけるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路は、腫瘍休眠を誘導するためのユビキタスな分子標的となると結論された。さらに本発明者らは、

腫瘍血管形成には、特にPDGF-Aが寄与しており、PDGF-AホモダイマーによるPDGFR α 活性化を阻害することにより、効果的に腫瘍の血管形成を阻害することができるを見出した。すなわちPDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害することにより、腫瘍血管系の形成および維持を阻害し、腫瘍を虚血に導き、増殖性および生存性を失わせることができる。

- [0013] PDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の阻害を確かめるには、例えば、PDGFR α のリガンド(PDGF-A、PDGF-B、PDGF-Cなど)の発現レベルの低下、PDGFR α の発現レベルの低下、PDGFR α とそのリガンドとの結合の低下、PDGFR α 活性化阻害(チロシンリン酸化レベルの低下やチロシンキナーゼ活性の低下)、p70S6キナーゼの発現または活性の低下などを指標にすることができる。すなわち、上記のようなPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達を阻害する化合物を選択することにより、抗腫瘍剤を選択することができる。PDGFR α やそのリガンド、あるいはp70S6キナーゼの発現が低下するかどうかは、例えば被験化合物存在下または非存在下でこれらの蛋白質またはその遺伝子(mRNA)の発現を測定し、該被験化合物存在下で有意に発現が阻害されるかどうかで判断することができる。また、PDGFR α とそのリガンドとの結合を阻害するかどうかは、例えば被験化合物存在下または非存在下でPDGFR α とそのリガンドとを接触させ、これらの結合が該被験化合物により阻害されるかどうかで判断することができる。チロシンのリン酸化やキナーゼ活性は、例えば[γ -³²P]ATPの取り込みや、抗リン酸化チロシン抗体などにより定量が可能である。
- [0014] ヒトPDGF-A遺伝子および蛋白質の配列は、Accession Nos. NM_002607 (protein ID NP_002598)(配列番号:1および2)、NM_033023 (protein ID NP_148983)(配列番号:3および4)、protein ID AAA60045 等に示されている(Bontron D.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:1492-1496 (1988); Rorsman F. et al., Mol. Cell. Biol. 8:571-577 (1988); Betsholtz C. et al., Nature 320:695-699 (1986); Hoppe J. et al., FEBS Lett. 223:243-246 (1987); Takimoto Y. et al., Hiroshima J. Med. Sci. 42:47-52 (1993); Tong B.D. et al., Nature 328:619-621 (1987); Collins T. et al., Nature 328:621-624 (1987); Andersson M. et al., J. Biol. Chem. 267:11260-11266 (1992))。他の生物のPDGF-Aは、例えばラット(protein ID S25096, CAA78490)

(Herren,B. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1173, 294–302 (1993))、マウス (Accession number NM_008808, protein ID NP_032834, protein ID A37359; Rorsman,F. and Betsholtz,C., *Growth Factors* 6, 303–313 (1992); Mercola,M. et al., *Dev. Biol.* 138, 114–122 (1990))、ニワトリ (Accession number BAB62542, protein ID AB031023; Horiuchi,H. et al., *Gene* 272, 181–190 (2001))、ウサギ (protein ID P34007; Nakahara,K. e al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 811–818 (1992)) などで知られている。

[0015] 哺乳動物のPDGF-A遺伝子は、既に知られているPDGF-A遺伝子に関しては、上記のPDGF-A遺伝子の配列を基にBLAST検索等により探し出すことができる (Altschul, S. F. et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403–410)。あるいは、既知のPDGF-A cDNAを基に設計したプライマーを用いたRT-PCR (実施例5参照) により得ることもできるし、またはPDGF-A cDNAをプローブにしてストリンジェントな条件におけるハイブリダイゼーションにより、ヒト、マウス、ラット、およびその他の哺乳動物および鳥類のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより得ることも容易である。ハイブリダイゼーションの条件は、PDGF-Aのコード配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5×SSC (1×SSC は 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrateを含む)、7%(W/V) SDS、100 μg/ml 変性サケ精子DNA、5×デンハルト液 (1×デンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む)を含む溶液中、48°C、好ましくは50°C、より好ましくは52°Cでハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度、より好ましくは60°C、さらにこの好ましくは65°C、最も好ましくは68°Cで2×SSC中、好ましくは1×SSC中、より好ましくは0.5×SSC中、より好ましくは0.1×SSC中で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

[0016] 哺乳動物PDGF-Aの塩基配列またはアミノ酸配列は、一般に既知のPDGF-Aの配列(例えば配列番号:1～4)と高いホモロジーを有する配列を含んでいる。高いホモロジーとは、70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85

%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有する配列である。配列の同一性は、例えばBLASTプログラムにより決定することができる(Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403–410)。具体的には、塩基配列の同一性を決定するにはblastnプログラム、アミノ酸配列の同一性を決定するにはblastxプログラムを用い、例えばNCBI(National Center for Biothchnology Information)のBLASTのウェブページにおいて"Low complexity"などのフィルターの設定は全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて計算を行う(Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266–272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131–141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389–3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7:649–656)。パラメータの設定は、例えばopen gapのコストはヌクレオチドは5で蛋白質は11、extend gapのコストはヌクレオチドは2で蛋白質は1、nucleotide mismatchのペナルティーは-3、nucleotide matchの報酬は1、expect valueは10、wordsizeはヌクレオチドは11で蛋白質は2、Dropoff (X) for blast extensions in bitsはblastnでは20で他のプログラムでは7、X dropoff value for gapped alignment (in bits)はblastn以外では15、final X dropoff value for gapped alignment (in bits)はblastnでは50で他のプログラムでは25にする。アミノ酸配列の比較においては、スコアのためのマトリックスとしてBLOSUM62を用いることができる。2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム(Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247–250)により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、コーディング配列(CDS)の外側のギャップは無視して、PDGF-AのCDS全体(例えば配列番号:1または3のCDS、あるいは配列番号:2または4)に対する同一性の値を計算する。

- [0017] また、PDGF-Aには多型およびバリアントが存在し得る。例えばヒトPDGF-Aには、エクソン6を持つバリアント1 (NM_002607) とエクソン6を持たないバリアント2 (NM_033023) が知られている。PDGF-Aの多型およびバリアントは、一般に1つのPDGF-A分子種(例えば配列番号:1または3のCDS、あるいは配列番号:2または4)の塩基配列またはアミノ酸配列において1または複数の残基が置換、欠失、および/または挿入された配列を含み得る。公知のPDGF-Aの配列との違いは、通常30残基

以内、好ましくは20残基以内、好ましくは10残基以内、より好ましくは5残基以内、より好ましくは3残基以内、より好ましくは2残基以内である。アミノ酸の置換は、保存的置換であってもよい。保存的に置換した蛋白質は活性が維持されやすい。保存的置換は、例えば塩基性アミノ酸(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性アミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性アミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性アミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β 分岐アミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族アミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)などの各グループ内のアミノ酸間の置換などが挙げられる。

- [0018] ヒトPDGFR α 遺伝子および蛋白質の配列は、Accession number NM_006206 (protein ID NP_006197)(配列番号:5および6)、protein ID P16234 等に示されている (Matsui T. et al., Science 243:800–804 (1989); Claesson-Welsh L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:4917–4921 (1989); Kawagishi J. and Ku T., Genomics 30:224–232 (1995); Strausberg R.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899–16903 (2002); Cools J. et al., N. Engl. J. Med. 348:1201–1214 (2003); Karthikeyan S. et al., J. Biol. Chem. 277:18973–18978 (2002))。他の生物のPDGFR α 遺伝子は、例えばマウス (Accession number NM_011058, protein ID NP_035188)(Hamilton, T.G. et al., Mol. Cell. Biol. 23 (11), 4013–4025 (2003); Lih, C.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (10), 4617–4622 (1996); Do, M.S. et al., Oncogene 7 (8), 1567–1575 (1992))、ラット (Accession number XM_214030, protein ID XP_214030, P20786)(Lee, K.H. et al., Mol. Cell. Biol. 10 (5), 2237–2246 (1990); Herren, B. et al., Biochim. Biophys. Acta 1173 (3), 294–302 (1993))、ニワトリ (Accession number AF188842, protein ID AAF01460; Ataliotis, P., Mech. Dev. 94 (1–2), 13–24 (2000)) などで知られている。
- [0019] 哺乳動物のPDGFR α 遺伝子は、既に知られているPDGFR α 遺伝子に関しては BLAST検索等により探し出すことができる。あるいはヒトPDGFR α の塩基配列またはアミノ酸配列(配列番号:5または6)を基に設計したプライマーを用いたRT-PCRによ

り得ることもできるし、または既知のPDGFR α cDNAをプローブにしてストリンジエントな条件におけるハイブリダイゼーションにより、ヒト、マウス、ラット、およびその他の哺乳動物および鳥類のcDNAライブラリーをスクリーニングすることに得ることも容易である。ハイブリダイゼーションの条件は上記の条件を用いるとよい。他生物のPDGFR α の塩基配列またはアミノ酸配列は、公知のPDGFR α の配列(例えば配列番号:5のCDSまたは6)と高いホモロジーを有する配列を含んでいる。高いホモロジーとは、70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有する配列である。ギャップはミスマッチと同様に扱い、CDSの外側のギャップは無視して、PDGFR α のCDS全体(例えば配列番号:5のCDSまたは配列番号:6)に対する同一性の値を計算する。

[0020] また、PDGFR α には多型およびバリアントが存在し得る。例えばヒトPDGFR α の多型およびバリアントは、例えば配列番号:5のCDSまたは配列番号:6に記載の配列において1または複数の残基が置換、欠失、および/または挿入された配列を含むものである。残基の違いは、通常100残基以内であり、好ましくは50残基以内、より好ましくは30残基以内、より好ましくは10残基以内、より好ましくは5残基以内、より好ましくは3残基以内、より好ましくは2残基以内である。アミノ酸の置換は、保存的置換であってもよい。

[0021] PDGF-Aの発現を阻害するには、PDGF-Aの転写または翻訳を阻害したり、あるいはPDGF-A mRNAまたはPDGF-A蛋白質の安定性を低下または分解を促進させることにより実施することができる。典型的な方法としては、例えば、PDGF-A遺伝子に対してRNAi(RNA interference; RNA干渉)効果を有するRNAを用いてPDGF-Aの発現を抑制する方法が挙げられる。一般的にRNAiとは、標的遺伝子のmRNA配列の一部と相同な配列からなるセンスRNAおよびこれと相補的な配列からなるアンチセンスRNAを含むRNAにより、標的遺伝子mRNAの破壊が誘導され、標的遺伝子の発現が阻害される現象を言う(Genes Dev. 2001, 15:188–200; Elbashir, SM et al. (2001) Nature 411:494–498)。RNAi効果を持つ2本鎖RNAが細胞内に導入されると、DICERと呼ばれるRNase III核酸分解酵素ファミリーの一一種が2本鎖RNAと接触し、2本鎖RNAがsmall interfering RNA(siRNA)と呼ばれる小さな断片に分解される。このsiRNA

が標的mRNAを分解し発現を抑制する。またsiRNAは、このような細胞内プロセッシングにより生成したRNAでなくても、人工的に合成または発現させたRNA分子であっても機能することができる。siRNAにより、インビボにおいて標的遺伝子の発現を抑制する方法が知られている(Anton P. et al., Nature Vol. 418 38–39 2002; David L. et al., Nature genetics Vol. 32 107–108, 2002)。

- [0022] 標的遺伝子に対するsiRNAは、通常、この遺伝子の転写配列(mRNA配列)における連続する15塩基以上の配列(より好ましくは16塩基以上、17塩基以上、18塩基以上、または19塩基以上の配列)、およびその相補配列を含み、これらの配列がハイブリダイズして2本鎖を形成するRNAである。好ましくは、連続する17–30塩基、より好ましくは18–25塩基の配列、より好ましくは19–23塩基の配列またはその相補配列を片方の鎖に含み、これとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするもう一方の鎖を含むRNAである。しかし、より長い配列を含むRNAであっても、細胞において、RNAi効果を有するsiRNAへ分解されることが期待されるため、RNAの長さは特に制限されないと考えられる。また、標的遺伝子のmRNAの全長もしくはほぼ全長の領域に対応する長鎖二本鎖RNAを、予めDICERまたは他のRNaseで分解し、その分解産物を利用することも可能である。この分解産物には、RNAi効果を有するRNA分子(siRNA)が含まれることが期待される。この方法によれば、RNAi効果を有することが期待されるmRNA上の領域を、特に選択しなくともよい。即ち、標的遺伝子のRNAi効果を有する配列は、必ずしも正確に規定される必要はないと考えられる。合成したsiRNAを使用する場合は、siRNAは適宜修飾することができる。
- [0023] 通常、末端に数塩基のオーバーハングを有する2本鎖RNAは、RNAi効果が高いことが知られている。本発明において用いるsiRNAは、必須ではないが、末端(好ましくは3'末端)に数塩基のオーバーハングを有することが望ましい。このオーバーハングを形成する塩基の長さは特に制限されないが、好ましくは2塩基のオーバーハングである。本発明においては例えば、TT(チミンが2個)、UU(ウラシルが2個)、その他の塩基のオーバーハングを有する2本鎖RNA(最も好ましくは19塩基対の2本鎖RNA部分と2塩基のオーバーハングを有する分子)を好適に用いることができる。本発明のsiRNAには、このようにオーバーハングを形成する塩基がDNAであるような分子も含

まれる。

- [0024] siRNAにおいて塩基対を形成する2つの鎖は、スペーサーを介して連結されていてもよい。すなわち、このスペーサーがループを形成して、その前後のRNA配列同士がアニールして2本鎖を形成するRNAも好適に用いることができる。スペーサーの長さに制限はないが、例えば3～23塩基としてよい。
- [0025] また、上記のsiRNAを発現し得るベクターもまた、本発明において使用することができる。即ち本発明は、RNAi効果を持つRNAを発現し得るベクターの使用に関する。上記RNAを発現し得るベクターは、例えば2本鎖からなるsiRNAの一方の鎖と他方の鎖が別々に発現するように、それぞれ別々のプロモーターと連結した核酸であってよい。あるいは選択的スプライシング等により1つのプロモーターから2種のRNAが転写されるようにしてもよい。あるいは、センス鎖とアンチセンス鎖がスペーサー(ループを形成する)を介して連結された一本鎖RNAを発現するベクターであってもよい。このベクターから発現したRNAは、RNAi効果を持つRNAシステムを形成して標的遺伝子の発現を抑制する。システムの長さは上記のsiRNAと同様であるが、例えば19～29塩基としてよい。スペーサーの長さに制限はないが、例えば3～23塩基としてよい。5'および/または3'に数塩基のオーバーハングを有していても、いなくてもよい。これらのベクターは、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術により、容易に作製することができる(Brummelkamp TR et al. (2002) Science 296: 550–553; Lee NS et al. (2001) Nature Biotechnology 19: 500–505; Miyagishi M & Taira K (2002) Nature Biotechnology 19: 497–500; Paddison PJ et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 1443–1448; Paul CP et al. (2002) Nature Biotechnology 19: 505–508; Sui G et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99(8): 5515–5520; Proc Natl Acad Sci USA 99: 14943–14945, 2002; Paddison, PJ et al. (2002) Genes Dev. 16:948–958)。より具体的には、目的のRNA配列をコードするDNAを公知の種々の発現ベクターへ適宜挿入することによって構築することが可能である。プロモーターとしては、RNAポリメラーゼIIIプロモーターなどを好適に用いることができる。具体的には、例えばU6 Pol IIIプロモーター、およびH1 RNAプロモーター(H1 RNAはRNasePを構成する一成分である)などが利用できる。

- [0026] 以下に、好ましいsiRNAの一例を例示するが、本発明において用いられるsiRNAはこれらに限定されない。まず、標的遺伝子の開始コドンから、50塩基以上、好ましくは60塩基以上、より好ましくは70塩基以上下流の転写配列領域を選択する。該領域からAA配列を見つけ、該AAに続く17~20ヌクレオチド(例えばAAに続く19ヌクレオチド)を選択する。AAの次の塩基は特に制限はないが、GまたはCである配列が好適には選択される。ここで、選択する配列のGC含量は、20~80%であることが好ましく、より好ましくは30~70%、より好ましくは35~65%である。また、選択した配列は、siRNAを投与する組織で発現する遺伝子の中で、標的遺伝子に特異的な配列であることが好ましい。例えば、公共の遺伝子配列データベースで選択配列をqueryにして検索し、投与個体の遺伝子の中で標的遺伝子以外に同一の配列を転写配列を持つ遺伝子が存在しないことを確認することが好ましい。また配列は、標的遺伝子の蛋白質コード配列(CDS)内から選択することが好ましい。このようにして選択された配列の初めのAAを除く配列を含む配列(好ましくは、3'にUUまたはTTが付加されている)、およびその相補配列(好ましくは3'にUUまたはTTを有する)は、好適なsiRNAとなる。必ずしもAAに続く配列を探す必要はなく、例えばCAに続く配列を上記と同様に探してもよい。あるいは他の任意の配列であってもよい。複数種作製されたsiRNAから、最適なRNAi効果を有するRNAを適宜選択することも可能である。
- [0027] siRNAの作用には非対称性があることが知られている(Schwarz, DS. Et al., 2003, Cell 115:199~208; Khvorova A et al., Cell, 2003, 115(2):209~16)。すなわち、siRNAのセンス鎖(標的mRNA側)の3'側の2本鎖形成が、5'側のそれよりも不安定になるよう配列を選択することで、標的mRNAに対するRNAi効果をより高めることができる。このために、センス鎖3'側に1から数個のミスマッチを導入してもよい。
- [0028] また、PDGF-Aの発現を阻害するには、siRNAを用いる以外にも、例えばPDGF-A遺伝子の転写産物またはその一部に対するアンチセンス核酸を用いたり、あるいはPDGF-A遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイムを用いることができる。標的遺伝子の発現を阻害する方法として、アンチセンス技術を利用する方法が当業者によく知られている。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を阻害する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、

RNAポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造が作られた部位とのハイブリッド形成による転写阻害、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング阻害、スプライソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング阻害、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行阻害、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング阻害、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始阻害、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳阻害、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻害、および核酸と蛋白質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現阻害などである。このようにアンチセンス核酸は、転写、スプライシングまたは翻訳など様々な過程を阻害することで、標的遺伝子の発現を阻害する(平島および井上著、新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現、日本生化学会編、東京化学同人、1993年、p.319-347)。

- [0029] 本発明で用いられるアンチセンス核酸は、上記のいずれの作用によりPDGF-A遺伝子の発現を阻害してもよい。アンチセンス核酸としては、PDGF-A遺伝子の転写される配列の連続した13ヌクレオチド以上、好ましくは14ヌクレオチド以上、さらに好ましくは15ヌクレオチド以上に対するアンチセンス配列を含む核酸であってよい。例えば、初期転写配列中のエクソン-イントロン境界、イントロン-エクソン境界、翻訳開始コドンを含む領域、5'端近傍の非翻訳領域、または成熟mRNA中の蛋白質コード配列(CDS)の連続した13ヌクレオチド以上、好ましくは14ヌクレオチド以上、さらに好ましくは15ヌクレオチド以上に対するアンチセンス配列を含む核酸などが好ましい。また臨床応用を考慮する場合、使用されるアンチセンス核酸は、通常、合成オリゴマーである。アンチセンス核酸はDNAであってよく、さらに修飾されていてもよい。例えば、ヌクレアーゼ分解に対する感受性を減らし、且つアンチセンス核酸としての活性を維持するために、Sオリゴ(ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド)を用いててもよい。アンチセンス核酸を用いて標的遺伝子の発現を効果的に抑制するには、アンチセンス核酸の長さは、好ましくは17塩基以上であり、より好ましくは20塩基以上、より好ましくは25塩基以上、より好ましくは30塩基以上、より好ましくは40塩基以上、より好ましくは50

塩基以上であり、さらに好ましくは100塩基以上である。アンチセンスRNAは細胞内で発現させることもできる。標的細胞で活性を持つプロモーターの下流に目的のRNAをコードする核酸を連結したベクターを作製し、これを細胞に導入すればよい。

- [0030] ベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、マイナス鎖RNAウイルスベクターなどのウイルスベクターやプラスミドなどの非ウイルスベクターなどが利用できる。これらのベクター系または遺伝子導入用の担体(リポソーム、カチオン脂質など)を利用して、腫瘍に投与を行う遺伝子治療が可能となる。
- [0031] また、PDGF-A遺伝子の発現の阻害は、リボザイム、またはリボザイムをコードするベクターを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子を指す。リボザイムには種々の活性を有するものが存在し、RNAを部位特異的に切断するリボザイムの設計も可能である。リボザイムには、グループIインtron型やRNase Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーへッド型(Rossi et al. (1991) Pharmac. Ther. 50: 245–254)やヘアピン型(Hampel et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 299–304, and U.S. Pat. No. 5,254,678)と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素、1990年、35、2191)。
- [0032] 例え、ハンマーへッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15という配列のC15の3'側を切断するが、その活性にはU14とA9との塩基対形成が重要とされ、C15の代わりにA15またはU15でも切断され得ることが示されている(Koizumi, M.ら著、FEBS Lett、1988年、228、228.)。基質結合部位が標的部位近傍のRNA配列と相補的なリボザイムを設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムが作出できる(Koizumi, M.ら著、FEBS Lett, 1988年、239, 285.、小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素、1990年、35, 2191.、Koizumi, M.ら著、Nucl Acids Res、1989年、17, 7059.)。
- [0033] また、ヘアピン型リボザイムも本発明の目的に有用である。このリボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(Buzayan, JM., Nature, 1986年、323, 349.)。ヘアピン型リボザイムからも、標的特異的なRNA切

断リボザイムを作出できることが示されている(Kikuchi, Y. & Sasaki, N., Nucl Acids Res, 1991, 19, 6751.、菊池洋, 化学と生物, 1992, 30, 112.)。このように、リボザイムを用いて標的遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を阻害することができる。

- [0034] リボザイムをベクターから発現させる場合は、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、マイナス鎖RNAウイルスベクターなどのウイルスベクター、あるいはプラスミドなどの非ウイルスベクターなどがベクターとして利用できる。
- [0035] 発現の阻害効果は、定量的RT-PCRなどによるmRNAレベルの測定や、抗体を用いたウェスタンブロッティングなどによる蛋白質レベルの測定により検証することができる。PDGF-Aおよび/またはPDGFR α の発現を抑制する化合物をスクリーニングすることにより、効果的に抗腫瘍剤をスクリーニングすることができる。本発明は、抗腫瘍剤製造における、PDGFR α またはそのリガンドの発現を抑制する化合物の使用にも関する。また本発明は、PDGFR α またはそのリガンドの発現を抑制する化合物および薬学的に許容できる所望の担体および/または添加物等を含む組成物を製造する工程を含む、抗腫瘍剤の製造方法にも関する。
- [0036] また、PDGF-AAとPDGFR α との結合の阻害は、例えばPDGF-AAまたはPDGFR α に結合し、PDGF-AAとPDGFR α との結合を阻害する化合物を用いて実施することができる。PDGFR α とそのリガンドとの結合は、例えば一方を担体に固定化しておき、他方をそれに接触させ、結合したもの用いて検出することができる。また、免疫沈降やプルダウンアッセイにより結合を検出することもできる。あるいは、PDGFR α を発現する細胞にリガンドを接触させ、PDGFR α を介したシグナル伝達(チロシンリン酸化や細胞増殖作用)などを検出することによりPDGFR α とリガンドとの結合をアッセイすることもできる。これらの方法によりPDGFR α とそのリガンドとの結合を測定し、その結合を阻害する化合物をスクリーニングすることにより、効果的に抗腫瘍剤をスクリーニングすることもできる。本発明は、抗腫瘍剤製造における、PDGFR α とそのリガンドとの結合を阻害する化合物の使用にも関する。また本発明は、PDGFR α とそのリガンドとの結合を阻害する化合物および薬学的に許容できる所望

の担体および/または添加物等を含む組成物を製造する工程を含む、抗腫瘍剤の製造方法にも関する。

- [0037] PDGF-AAとPDGFR α との結合を阻害する化合物として、PDGFR α またはそのリガンドに結合し、両者の結合を阻害する蛋白質を比較的容易に作製することができる。より具体的には、PDGFR α の細胞外ドメインに結合する抗体またはその断片(抗体可変領域、CDRs(相補性決定領域)等)を含むポリペプチド、PDGF-AAに結合する抗体またはその断片を含むポリペプチド、PDGF-Aの受容体結合断片、およびPDGFR α のリガンド結合部位を含む可溶性ポリペプチド(または分泌性ポリペプチド)等を好適に用いることができる。PDGFR α の細胞外ドメインに結合する抗体は、例えば、PDGFR α の細胞外ドメインまたはその一部からなるポリペプチドを抗原として、哺乳動物に免疫することにより作製することができる。あるいは、PDGFR α を発現する細胞またはその膜画分等を抗原として用いてもよい。抗原として用いられるPDGFR α の細胞外ドメインとしては、天然に見られる可溶型PDGFR α (Tiesman J, Hart CE., J Biol Chem., 1993, 268(13):9621-8)、およびPDGFR α の細胞外ドメインを含む人工的に作製した断片を用いることができる。例えば、ヒトPDGFR α (配列番号:6) の24番目から524番目までのアミノ酸配列またはその部分を抗原として用いることが好ましい。他の哺乳動物PDGFR α の細胞外ドメインは、ヒトPDGFR α のアミノ酸配列とのアライメントにより同定することができる。脾臓細胞からハイブリドーマを作製し、PDGFR α の細胞外ドメインに高い親和性で結合する抗体を產生するハイブリドーマを選択すれば、目的の抗体を產生する細胞クローンを得ることができる(V.T. Oi and L.A.Herzenberg (1980) Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. in (B.B.Misbell and S.M.Shiigi eds) Selected method in cellular immunology. pp351-372; 岩崎辰夫ら(1983)单クローン抗体、ハイブリドーマとELISA、講談社、東京; 富山朔二・安東民衛 編(1987) 单クローン抗体実験マニュアル、講談社、東京)。この細胞から抗体遺伝子を単離することにより、目的の抗体の遺伝子を得ることができる。これをベクターに搭載することによって、PDGFR α の細胞外ドメインに結合する抗体を発現するベクターが得られる。
- [0038] PDGFR α リガンドに結合する抗体を得るには、PDGFR α リガンドまたはその一部を

抗原として上記と同様に免疫して抗体またはその遺伝子を得ることができる。抗体は、PDGFR α リガンドのダイマーに対する抗体であってもよい。PDGFR α リガンドとしては、PDGF-A, -B, および-Cが挙げられるが、特にPDGF-Aに対する抗体が好ましい。例えば、PDGF-Aホモダイマーに対する抗体を好適に用いることができる。

- [0039] 抗体は、例えば硫酸沈殿、プロテインAカラム、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、抗原をカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することができる。抗体は、PDGF-AまたはPDGFR α に結合し、PDGF-AとPDGFR α との結合を阻害する限り、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、ヒト抗体、遺伝子組み換えによるヒト型化抗体、さらに抗体可変領域を含む断片(Fab, Fc, F(ab')2, scFv等を含む)、および抗体修飾物等であってもよい。抗体または抗体発現ベクターをヒトに投与する目的(抗体治療)で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。
- [0040] PDGF-AまたはPDGFR α に結合する抗体は、商業的に入手することも可能である(例えば Rabbit anti-human PDGF-AA, Cat.No. IM-R136, DIACLONE; Anti-Human Platelet Derived Growth Factor-AA (PDGF-AA) Antibody, Leinco Technologies Inc.; Anti-PDGF-AA neutralizing goat antibody, R&D systems; Anti-PDGFR α neutralizing goat antibody, R&D systems)。
- [0041] PDGFR α のリガンド結合部位を含む分泌性ポリペプチドとしては、PDGFR α の細胞外ドメイン含む分泌蛋白質を好適に用いることができる。このような蛋白質は天然にも知られている(Tiesman J, Hart CE., J Biol Chem., 1993, 268(13):9621-8)。あるいは、PDGFR α の細胞外ドメインを含む人工的に作製した分泌蛋白質を用いることができる(実施例参照)。PDGFR α の細胞外ドメインは5つのimmunoglobulin (Ig)-likeドメインを持ち、そのうち最初の3つのドメイン(domain 1-3)(ヒトPDGFR α (配列番号:6)の24番目から341番目のアミノ酸)がリガンド結合活性を示すことが知られている(D. Mahadevan et al., J. Biol. Chem., 270, 1995, 27595-27600; B Herren et al., J. Biol. Chem., 268, 15088-15095, 1993)。従って、この3つのIg-like領域、好ましくは5つのIg-like領域(ヒトPDGFR α (配列番号:6)の24番目から524番目のアミノ酸)を含む分泌蛋白質を用いることによって、PDGF-AAを吸収させ内在性受容体への結合

を阻害することができる。蛋白質を分泌させるために、N末端には適宜分泌シグナル配列を付加することができる。分泌シグナル配列としては、例えばヒトPDGFR α の1番目から23番目までのアミノ酸を用いればよく、ヒトPDGFR α の1番目から524番目のアミノ酸を含む可溶性蛋白質を好適に用いることができる。他の哺乳動物PDGFR α の細胞外ドメインは、ヒトPDGFR α のアミノ酸配列とのアライメントにより同定すればよい。

- [0042] ベクターを介した遺伝子治療により上記の蛋白質を発現させるには、遺伝子組み換え技術により上記の蛋白質をコードする核酸を搭載するベクターを構築することができる。ここで蛋白質をコードすることは、核酸が該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするORFをセンスまたはアンチセンス(ある種のウイルスベクター等においては)に含むことを言う。核酸はベクターの種類にあわせて一本鎖または二本鎖であってよい。また核酸はDNAであってもRNAであってよい。ベクターとしては、例えばプラスミドベクター、その他のnaked DNA、ウイルスベクター等が挙げられる。
- [0043] Naked DNAとは、DNAが、ウイルスエンベロープ、リポソーム、またはカチオニック脂質などの核酸を細胞に導入する試薬と結合していないDNAを言う(Wolff et al., 1990, Science 247, 1465–1468)。この場合、DNAは生理的に許容可能な溶液、例えば滅菌水、生理食塩水、または緩衝液中に溶解して使用することができる。プラスミドなどのnaked DNAの注入は最も安全で簡便な遺伝子送達法であり、これまでに承認されている臨床プロトコルの多くを占める(Lee, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 272: 230–235)。例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターは入手可能な最も強力な転写制御配列の1つであり、CMVプロモーターを含むベクターは臨床の遺伝子治療にも広く用いられている(Foecking, M.K, and Hofstetter H. Gene 1986; 45: 101–105)。また、CMV immediately early エンハンサーおよびニワトリ β アクチンプロモーターを含むキメラプロモーターであるCAGプロモーター(Niwa, H. et al. (1991) Gene. 108: 193–199)は、CMVプロモーター以上に強い発現が可能であり好適に用いられる。
- [0044] ベクターに目的遺伝子を組み込む場合は、目的遺伝子の発現効率を高めるため、

開始コドン周辺の配列はKozakのコンセンサス配列 [例えばCC(G/A)CCATG] とすることが好ましい (Kozak, M., Nucleic Acids Res 9(20), 5233 (1981); Kozak, M., Cell 44, 283 (1986); Kozak, M. Nucleic Acids Res.15:8125 (1987); Kozak, M., J. Mol. Biol. 196, 947 (1987); Kozak, M., J. Cell Biol. 108, 229 (1989); Kozak, M., Nucl. Acids Res. 18, 2828 (1990))。

- [0045] DNAは適宜トランスフェクション試薬と組み合わせて投与することができる。例えば、リポソームまたは所望のカチオニック脂質と結合させてトランスフェクション効率を上昇させることができる。
- [0046] 本発明に用いられるより好ましいベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターを用いることによって、幅広い組織において十分な量のポリペプチドを発現させることができ。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、マイナス鎖RNAウイルスベクターなどが挙げられるがこれらに制限はない。好ましいウイルスベクターの1つはアデノウイルスベクターである。アデノウイルスベクターは、広範囲の組織に高い効率で遺伝子を導入し、導入遺伝子を高発現させることができる。本発明においてはアデノウイルスベクターを好適に用いることができる。本発明において、アデノウイルスベクターは適宜公知のベクターを用いることができ、それらは例えば外来遺伝子発現の向上のため、または抗原性の減弱などのために野生型ウイルスの遺伝子が改変されていてよい。アデノウイルスベクターの作製は、例えば斎藤らにより開発されたCOS-TPC法 (Miyake, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1320–1324 (1996)) を用いることができる。
- [0047] 本発明において好適に用いることができるウイルスベクターの他の1つは、マイナス鎖RNAウイルスベクターである。実施例に示すように、マイナス鎖RNAウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、インビボにおいて腫瘍増殖を有意に抑制することが示された。マイナス鎖RNAウイルスベクターは、本発明において最も好適に用いられるベクターの1つである。マイナス鎖RNAウイルスとは、マイナス鎖(ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖に対するアンチセンス鎖)のRNAをゲノムとして含むウイルスである。マイナス鎖RNAはネガティブ鎖RNAとも呼ばれる。本発明において用いられるマイナス

鎖RNAウイルスとしては、特に一本鎖マイナス鎖RNAウイルス(非分節型(*non-segmented*)マイナス鎖RNAウイルスとも言う)が挙げられる。「一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルス」とは、一本鎖ネガティブ鎖[すなわちマイナス鎖]RNAをゲノムに有するウイルスを言う。このようなウイルスとしては、パラミクソウイルス(Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, および Pneumovirus属等を含む)、ラブドウイルス(Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む)、フィロウイルス(Filoviridae)、オルトミクソウイルス(Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like viruses 等を含む)、ブニヤウイルス(Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, および Phlebovirus属等を含む)、アレナウイルス(Arenaviridae)などの科に属するウイルスが含まれる。本発明において用いられるマイナス鎖RNAウイルスベクターは、伝播能を有していてもよく、伝播能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「伝播能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

- [0048] 特にPDGF-Aに結合する抗体、PDGFR α の細胞外ドメインに結合する抗体、またはそれらの抗原結合断片を含む分泌性蛋白質をコードするマイナス鎖RNAウイルスベクター、ならびにPDGFR α のリガンド結合ドメインを含む分泌性蛋白質をコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターは、本発明における抗腫瘍剤として有用である。これらのベクターを直接または間接に腫瘍に投与することにより、腫瘍の増殖を抑制することができる。間接投与のためには、例えば樹状細胞などにベクターを導入し、この細胞を腫瘍に投与することができる。
- [0049] 本発明において特に好適に用いられるマイナス鎖RNAウイルスを具体的に挙げれば、例えばパラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)ウイルスのセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス(SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1,2,3型、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(Influenza virus)、ラブドウイルス

科(Rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus)、狂犬病ウイルス(Rabies virus)等が例示できる。

- [0050] 本発明において用いることができるウイルスをさらに例示すれば、例えば Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin molbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、Nipah virus (Nipah)、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5 (SV5)、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、およびNewcastle disease virus (NDV) などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin molbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、および Nipah virus (Nipah) からなる群より選択されるウイルスが挙げられる。
- [0051] 本発明において用いられるウイルスベクターは、より好ましくは、パラミクソウイルス亜科(レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモルビリウイルス属を含む)に属するウイルスまたはその誘導体であり、より好ましくはレスピロウイルス属(genus Respirovirus) (パラミクソウイルス属(Paramyxovirus)とも言う)に属するウイルスまたはその誘導体である。誘導体には、ウイルスによる遺伝子導入能を損なわないように、ウイルス遺伝子が改変されたウイルス、および化学修飾されたウイルス等が含まれる。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパライフルエンザウイルス1型(HPIV-1)、ヒトパライフルエンザウイルス3型(HPIV-3)、ウシパライフルエンザウイルス3型(BPIV-3)、センダイウイルス(Sendai virus; マウスパライフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパライフルエンザウイルス10型(SPIV-10)などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。

- [0052] 組み換えマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成は公知の方法を利用して行うことができる(WO97/16539; WO97/16538; WO00/70055; WO00/70070; WO03/025570; PCT/JP03/07005; PCT/JP2004/000944; Durbin, A. P. et al., 1997, *Virology* 235: 323–332; Whelan, S. P. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388–8392; Schnell, M. J. et al., 1994, *EMBO J.* 13: 4195–4203; Radecke, F. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 5773–5784; Lawson, N. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4477–4481; Garcin, D. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 6087–6094; Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569–579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, *J. Virol.* 71: 1265–1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15400–15404; Hasan, M. K. et al., *J. Gen. Virol.* 78: 2813–2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, *EMBO J.* 16: 578–587; Yu, D. et al., 1997, *Genes Cells* 2: 457–466)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むマイナス鎖RNAウイルスをDNAから再構成させることができる。これらの方法に準じて、本発明において用いられるマイナス鎖RNAウイルスを再構成させることができる。ウイルスゲノムをコードするDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子等のエンベロープを構成する蛋白質をコードする遺伝子をウイルスゲノムから欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質(例えば水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus; VSV)のG蛋白質(VSV-G) (*J. Virology* 39: 519–528 (1981)))をコードする遺伝子などを別途、ウイルス産生細胞に導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることができる(Hirata, T. et al., 2002, *J. Virol. Methods*, 104:125–133; Inoue, M. et al., 2003, *J. Virol.* 77:6419–6429)。
- [0053] マイナス鎖RNAウイルスは宿主細胞の細胞質でのみ転写・複製を行い、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み(integration)は起こらない(Lamb, R.A. and Kolakofsky, D., *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). *Fields Virology*, 3rd Edition, Vol. 2. Lippincott –

Raven Publishers: Philadelphia, 1996, pp. 1177–1204)。このため染色体異常による癌化および不死化などの安全面における問題が生じない。マイナス鎖RNAウイルスのこの特徴は、ベクター化した時の安全性に大きく寄与している。異種遺伝子発現の結果では、例えばセンダイウイルス(SeV)を連續多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、ゲノムの安定性が高く、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている(Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457–466 (1997))。また、カプシド構造蛋白質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性(flexibility)など性質上のメリットがある。またセンダイウイルスは、齧歯類にとって病原性で肺炎を生じることが知られているが、ヒトに対しては病原性が認められない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト靈長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によつても支持されている(Hurwitz, J.L. et al., Vaccine 15: 533–540, 1997; Bitzer, M. et al., J. Gene Med., 5: 543–553, 2003)。マイナス鎖RNAウイルスベクターは、本発明において用いられるベクターとして極めて有用である。

- [0054] 回収したウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション(濾過)、遠心分離、吸着、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその任意の組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターを含む溶液中で該ウイルスの成分が主要な割合を占めることを言う。例えば実質的に純粋なウイルスベクター組成物は、溶液中に含まれる全蛋白質(但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く)のうち、ウイルスベクターの成分として含まれる蛋白質の割合が10% (重量/重量) 以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。例えばパラミクソウイルスベクターであれば、具体的な精製方法としては、セルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法(特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報)、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法(WO97/32010)等を例示することができるが、これらに制限されない。

- [0055] 腫瘍増殖の抑制は、上記に記載したPDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する化合物、核酸、蛋白質、あるいはそれらを発現するベクターを、腫瘍に投与することにより行われる。ここで「腫瘍に投与する」とは、腫瘍の血管系の形成および/または維持を阻害するように、腫瘍内または腫瘍の近傍に投与することを言う。近傍とは、腫瘍に十分近い領域であって、投与領域の血管系の破壊により腫瘍への血液供給を有意に低下させ得る領域である。通常は、腫瘍から9 mm以内、好ましくは8 mm以内、より好ましくは7 mm以内、より好ましくは6 mm以内、より好ましくは5 mm以内、より好ましくは3 mm以内の領域である。投与物または投与したベクターからの発現産物により、PDGFR α -p70S6キナーゼシグナル伝達が阻害され、腫瘍近傍の血管系の形成および維持が阻害される。これにより、腫瘍への血液供給が遮断され、腫瘍増殖が抑制される。投与化合物またはベクターは、担体と組み合わせた組成物として投与することができる。用いられる担体としては、生理的に許容できるものであれば制限はなく、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的にはコラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体などがあげられる。更に担体はこれらの生理的に許容される材料の混合組成物でも良い。ベクターを投与する場合は、ウイルスベクター、あるいは非ウイルスベクターも含めて、所望のベクターが利用できる。ベクターから分泌性蛋白質を発現させる場合は、ベクターを投与した細胞の形態で投与してもよい(ex vivo投与)。例えばベクターまたはベクターを導入した細胞の腫瘍内注入が考えられる。細胞としては、例えば樹状細胞(Dendritic cells; DCs)が好ましい。注入手段は通常の医療用注射器または、体外および体内に留置される持続注入器などの工業製品があげられる。
- [0056] Ex vivo投与のために樹状細胞を用いる場合は、例えばリンパ球系樹状細胞(Th2への誘導または免疫寛容を誘導するものであってもよい)、骨髄球系樹状細胞(一般的に用いられる樹状細胞。未熟樹状細胞および成熟樹状細胞を含む)、ランゲルハンス細胞(皮膚の抗原提示細胞で重要な樹状細胞)、相互連結細胞(リンパ節、脾臓のT細胞領域にあり、T細胞への抗原提示に働いていると考えられている細胞)、ろ胞樹状細胞(B細胞への抗原提示細胞として重要、抗原と抗体複合体、抗原と補体複

合体を抗体レセプター、補体レセプターにより、樹状細胞上に提示することで、B細胞に抗原提示している。)などを用いることができる。樹状細胞は、例えば、CD1a⁺、HLA-class II⁺、およびCD11c⁺の細胞で、かつT細胞マーカー(CD3)、B細胞マーカー(CD19、CD20)、NK細胞マーカー(CD56)、好中球マーカー(CD15)、単球マーカー(CD14)を発現していない細胞である。これらのマーカー遺伝子の発現については、以下の文献も参照のこと(Knapp, W. et al., eds., 1989, Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Barclay, N.A. et al., eds., 1993, The Leucocyte Antigen FactsBook, CD11 Section, Academic Press Inc., San Diego, California, p. 124; Stacker, S.A. and T.A. Springer, 1991, J. Immunol. 146:648; Knapp, W. et al., eds., 1989, Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Hanau, D. et al., 1990, J. Investigative Dermatol. 95: 503; Calabi, F. and A. Bradbury., 1991., Tissue Antigens 37: 1; McMichael, A.J. et al., eds., 1987, Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Knapp, W. et al., eds., 1989, Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Wright , S.D. et al., 1990, Science 249:1434; Pawelec, G. et al., 1985, Human Immunology 12:165; Ziegler, A. et al., 1986, Immunobiol. 171:77)。これらのマーカーに対する抗体は、例えばBD Biosciences社(BD PharMingen)より入手することができ、その詳細は同社または販売代理店のウェブサイトで知ることができる。

[0057] また、樹状細胞マーカーに関しては、以下のKiertscherらおよびOehlerらの文献も参照のこと(Kiertscher SM, Roth MD, Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4, J. Leukoc. Biol., 1996, 59(2):208-18; Oehler, L. et al., Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell

characteristics., J. Exp. Med., 1998, 187(7):1019–28)。各マーカーの発現については、例えば、isotype control antibodyで染色した時に、陽性率が1%以下の蛍光強度を境界として、それ以上は陽性、それ未満は陰性と判断される。

- [0058] 樹状細胞またはその前駆細胞の調製は、公知の方法に従ってまたは準じて行うことができる。例えば、血液(例えば末梢血または臍帯血)、骨髓、リンパ節、他のリンパ器官、脾臓、皮膚などから分離することができる。好ましくは、樹状細胞は、本発明に使用するために血液または骨髓から得られる。また、本発明で用いられる樹状細胞は、皮膚のラングルハンス細胞、輸入リンパ管のベール細胞、ろ胞樹状細胞、脾臓の樹状細胞、およびリンパ器官の指状突起細胞などであってもよい。また本発明で用いられる樹状細胞は、CD34⁺由来樹状細胞、骨髓由来樹状細胞、単球由来樹状細胞、脾細胞由来樹状細胞、皮膚由来樹状細胞、濾胞樹状細胞、および胚中心樹状細胞からなる群から選択される樹状細胞が含まれる。CD34⁺由来樹状細胞は、臍帯血または骨髓等から得た造血幹細胞または造血始原細胞等から、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、腫瘍ネクローシスファクター(TNF)-alpha、IL-4、IL-13、ステムセルファクター(SCF)、Flt-3リガンド、c-kitリガンド、またはその組み合わせなどにより分化させることができる。例えば、末梢血の単球をGM-CSFおよびIL-4により未成熟樹状細胞に分化させ、さらにTNF-alphaで刺激することにより成熟樹状細胞へと分化させることができる。
- [0059] 樹状細胞の具体的な単離方法は、例えば Cameron et al., 1992, Science 257: 383、Langhoff et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7998、Chehimi et al., 1993, J. Gen. Virol. 74: 1277、Cameron et al., 1992, Clin. Exp. Immunol. 88: 226、Thomas et al., 1993, J. Immunol. 150: 821、Karhumaki et al., 1993, Clin. Exp. Immunol. 91: 482 などに記載されている。また、フローサイトメトリーによる樹状細胞の単離については、例えば、Thomas et al., 1994, J. Immunol. 153: 4016、Ferbas et al., 1994, J. Immunol. 152: 4649、および O'Doherty et al., 1994, Immunology 82: 487 に記載されている。また、磁気細胞選別については、例えば Miltenyi et al., 1990, Cytometry 11: 231–238 に記述されている。
- [0060] また、例えばヒト樹状細胞の単離および増殖に関しては、Macatonia et al., 1991,

Immunol. 74: 399–406、O'Doherty et al., 1993, J. Exp. Med. 178: 1067–1078、Markowicz et al., 1990, J. Clin. Invest. 85: 955–961、Romani et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 83–93、Sallusto et al., 1994, J. Exp. Med. 179: 1109–1118、Berhard et al., 1995, J. Exp. Med. 55: 1099–1104 などに記載の方法を用いてもよい。また、骨髓、臍帯血、または末梢血等から得られるCD34⁺細胞および末梢血由来の単核細胞からの樹状細胞形成については Van Tendeloo et al., 1998, Gene Ther. 5: 700–707 に記載の方法を用いて実施してもよい。

- [0061] 本明細書に記載した抗腫瘍薬の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状、投与組成物の形態、投与方法等により異なってよく、当業者であれば適宜調整することが可能である。投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、投与部位についても一箇所または複数箇所投与してよい。非ペプチド性低分子化合物であれば、通常成人(体重60kgとして)においては、経口投与なら一般的に、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によって異なるが、例えば注射剤の形ではにおいては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与することができる。他の動物の場合も、例えば上記の投与量を体重で換算した量を投与することができる。蛋白質製剤であれば、投与量は例えば1日あたり約100 μgから50mgあると考えられる。例えばウイルスベクターであれば、腫瘍内またはその近傍に1箇所または複数箇所(例えば2から10箇所)に投与してよい。投与量は、アデノウイルスであれば、例えば 10^{10} ～ 10^{13} pfu、より好ましくは 10^{11} ～ 10^{13} pfuが望ましい。マイナス鎖RNAウイルスであれば、例えば 2×10^5 CIU～ 5×10^{11} CIUが望ましい。Naked DNA、アンチセンス核酸、siRNA等であれば、腫瘍内またはその近傍に1箇所または複数箇所(例えば2から10箇所)に投与してよい。投与部位1箇所あたりの投与量は、例えば10 μg～10 mg、より好ましくは100 μg～1 mgが望ましい。Ex vivo投与において、ベクターを導入した細胞を投与する場合は、例えば MOI 1～500の間で体外(例えば試験管またはシャーレ内)で標的細胞にウイルスベクターを導入する。遺伝子導入細胞は、例えば 10^5 ～ 10^9 細胞、好ましくは 10^6 ～ 10^8 細胞を腫瘍

に移植することができる。投与量については、文献 Freedman SB et al Ann Intern Med 136:54-71 (2002) を参照することができる。治療の対象動物としては、ヒトおよびその他の所望の非ヒト哺乳動物が挙げられ、具体的にはヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなどが含まれる。

- [0062] また本発明は、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する化合物を有効成分として含む抗腫瘍剤にも関する。また本発明は、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する化合物の、抗腫瘍治療薬製造における使用にも関する。ここで、上記化合物としては、PDGF-A遺伝子のアンチセンスRNA、siRNA、および該アンチセンスRNAまたはsiRNAをコードするベクターが例示できる。さらに、PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質、または該分泌性蛋白質をコードするベクターが挙げられる。このような分泌蛋白質としては、PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する抗体、抗体断片、および可溶性PDGFR α 等が挙げられる。ベクターとしては、例えばマイナス鎖RNAウイルスベクターを好適に用いることができる。ベクターは、腫瘍へ局所的に投与のために注射剤等の形態に製剤化されることが好ましい。
- [0063] 上記の抗腫瘍剤は、有効成分以外に、薬学的に許容できる所望の担体および/または添加物等を含む組成物であってよい。例えば、滅菌水、生理食塩水、慣用の緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、安定剤、塩、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、界面活性剤、懸濁剤、等張化剤、または保存剤などを含んでよい。局所投与のために、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的にはコラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体などと組み合わせることも好ましい。注射に適当な剤型に調製するには、有効成分を薬学的に許容される水溶液中に溶解するか、または溶解できるように例えば凍結乾燥剤として調製する。また、有効成分を溶解または希釈するための担体と組み合わせてキットとしてもよい。このような担体としては、薬学的に許容できる所望の担体が挙げられ、例えば蒸留水、生理食塩水などが挙げられる。

実施例

[0064] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

[0065] 細胞および試薬

HSMC (J. Cell Biol., 1971, 50, 172–86)、MRC-5 (ATCC CCL-171)、SAS (J. Biol. Chem., 1995, 270(41), 24321–6)、MH134 (J. Natl. Cancer Inst., 1956, 17, 1–21)、QG56 (Int. J. Cancer, 1985, 35(6), 808–12)、TF (Cancer, 1992, 69(10), 2589–97)、KN (Cancer, 1992, 69(10), 2589–97)、EBC-1 (Am. J. Pathol., 1993, 142(2), 425–31)、PC9 (Int. J. Cancer, 1985, 15(4), 449–55)、および COS7細胞 (ATCC CRL-1651) はAmerican Type Culture Collection (ATCC) より購入した。以前の記載のように、以下の細胞内シグナル阻害剤を、それぞれ以下の濃度でHSMCおよびMRC5細胞に用いた (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723–730)。Ras, Ras-inhibitory peptide (50 μ mol/L, Alexis Japan, Tokyo, Japan); p70S6K, p70S6K inhibitor rapamycin (100 ng/ml, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan); PKC, PKC inhibitor bisindolylmaleimide (100 nmol/L, Sigma); PI3K, PI3K-inhibitor wortmannin (120 nmol/L, Sigma); MEK inhibitor U0126 (10 μ mol/L, Promega K.K., Tokyo, Japan); PKA, PKA-inhibitory peptide (1 μ mol/L, Calbiochem, San Diego, CA); およびNF-κB, NF-κB inhibitor ALLN (5 μ mol/L, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)。抗PDGF-AA-中和ヤギ抗体、抗PDGFR α 中和ヤギ抗体、およびコントロールのヤギ IgGはR&D systems (Minneapolis, MN) より入手した。マウスFGF-2をコードするSeV (SeV-FGF2) およびホタルルシフェラーゼをコードするSeV (SeV-luciferase) を含む、使用した組み換えSeVのストックは、以前の記載の通りに調製した (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966–973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723–730)。ヒト PDGFR α の細胞外ドメインを発現する組み換えSeVは以下のように構築した。制限酵素タグ付きの合成プライマー (forward-BglII: 5'-aaAGATCTatgggactccatccggc-3' (配列番号:9), reverse-NheI: 5'-ttGCTAGCtcacttgtcatcgctcctgtagtcttcagaacgcagggt-3' (配列番号:10)) を用いて、MRC-5細胞より抽出したtotal RNAより逆転写により合成したcDNAを鋳型にして、

てcDNA断片(増幅領域:CDSの1-1575塩基)を増幅し、pcDNA3.1 (InVitrogen, Carlsbad, CA)にサブクローニングした(配列番号:7および8)。capillary sequencer (model CEQ2000L, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA)を用いて、全配列が報告されているもの(GenBank No. NM_006206)と完全に一致することを確認し、SeV18+をコードする鋳型プラスミドにサブクローニングした(Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997)。以前の記載のように、可溶性ヒトPDGFR α を発現する組み換えSeV (SeV-hsPDGF α)を回収した(Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730; Yonemitsu Y et al., Nat Biotechnol. 2000;18:970-973)。ウェスタンブロッティングにより、SeV-hsPDGF α を導入したCOS7細胞の培養上清中に、可溶性ヒトPDGFR α が分泌されていることが確認された(データ非提示)。

[0066] 動物

雄C57BL/6(6週齢)およびbalb/c nu/nuマウス(5週齢)はKBT Oriental Co., Ltd. (Charles River Grade, Toso, Saga, Japan)より入手した。全ての動物実験は、認可された手順に従って実施し、九州大学における動物、組み換えDNA、および感染性病原体実験委員会による研究動物の飼育および使用の推奨手順および日本国政府の法律(No.105)および告知(No.6)に従った。

[0067] 肢虚血モデル

外科的処置および肢の予後評価の詳細は以前に記載されている(Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。遺伝子導入では、手術完了の直後に25 μ lのベクター溶液を大腿筋2箇所に注入した。内在性PDGF-AA活性のインビボ抑制は、PDGF-AA特異的中和ヤギポリクローナルIgG(ヒトおよびマウス蛋白質に交差反応する)(R&D)を用い、ディスポーザブルのマイクロ浸透圧ポンプ(Model 1007D, ALZA Co., Mountain View, CA)を介して以前の記載の通りに行った(Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。

[0068] 腫瘍移植

10^6 のSASまたはMH134細胞を腹壁の皮内に移植し、腫瘍容積を1日おきに評価し

た。移植から7日後、RAPA (1.5 mg/kg/day) を毎日腹腔内投与した。Day 7または28に、マウスを犠牲死させ腫瘍をELISAに供した。

[0069] 酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA)

以前の記載 (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966–973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723–730) の通り、マウス肢筋、腫瘍、および培養液中の蛋白質含量を、Quantikine Immunoassay systemsを用い、製造元の説明に従ってマウス (164および220アミノ酸残基型の両方を認識) およびヒトVEGF-A、ヒトFGF-2 (ヒトおよびマウスの両方を認識)、ヒトHGF (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)、およびラットHGF (マウスHGFも認識, Institute of Immunology Inc. Tokyo, Japan)について決定した。

[0070] ノーザンプロット解析

全細胞RNAをISOGEN system (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) で単離し、電気泳動しナイロンメンブレンに転写した。メンブレンは、ランダム [α -³²P]dCTPラベルしたプローブと60°Cで一晩ハイブリダイズさせた。バンドを可視化しphotoimagerでデンシティメーターに供した。

[0071] リアルタイムPCR

ISOGEN system を用いて虚血肢筋から全RNAを抽出し、RNaseフリーDNase (Boehringer) で処理した。分注 (25 ng) した全RNAを逆転写し、TaqMan EZ RT-PCR kitおよびSequence Detection System, model 7000 (PE Biosystems) を用いて製造元の説明に従いトリプリケートで増幅した。PCTプライマーおよびTaqManプローブの塩基配列を表に示した。マウスGAPDHコントロール試薬を内部標準として用いた。コントロールの全RNA (PE Biosystems) の連続希釈を用いて構築した相対標準曲線から製造元の説明に従い標的量を決定した。各試料において標的遺伝子の発現レベルをGAPDHレベルにより標準化した。

表1

リアルタイムPCRに用いたプライマーおよびプローブの配列

VEGF (アンプリコンサイズ: 137 bp)

VEGF-forward 5'-GCAGGCTGCTGTAACGATGAA-3' (配列番号:11)

VEGF-reverse 5'-TCACATCTGCTGTGCTGTAGGA-3' (配列番号:12)

VEGF-hybridization probe

5'-FAM-CATGCAGATCATGCGGATCAAACCTC-TAMRA-3' (配列番号:13)

HGF (アンプリコンサイズ: 87 bp)

HGF-forward 5'-CAGCAATAACCATTGGAATGGAAT-3' (配列番号:14)

HGF-reverse 5'-TTGAAGTTCTCGGGAGTGATATCA-3' (配列番号:15)

HGF-hybridization probe

5'-FAM-CGTTGGGATTCGCAGTACCCTCAC-A-TAMRA-3' (配列番号:16)

PDGF-A (アンプリコンサイズ: 125 bp)

PDGF-A-forward 5'-CGTCAAGTGCCAGCCTTCA-3' (配列番号:17)

PDGF-A-reverse 5'-ATGCACACTCCAGGTGTTCCCT-3' (配列番号:18)

PDGF-A-hybridization probe

5'-FAM-CACTTGGCACCTTGACACTGCG-TAMRA-3' (配列番号:19)

PDGFR α (アンプリコンサイズ: 148 bp)

PDGFR α -forward 5'-GAGCATCTCGACAACCTCTACAC-3' (配列番号:20)

PDGFR α -reverse 5'-CCGGTATCCACTCTTGATCTTATTG-3' (配列番号:21)

PDGFR α -hybridization probe

5'-FAM-CCCTATCCTGGCATGATGGTCGATTCT-TAMRA-3' (配列番号:22)

GAPDH (アンプリコンサイズ: 117 bp)

GAPDH-forward 5'-CCTGGAGAACCTGCCAAGTAT-3' (配列番号:23)

GAPDH-reverse 5'-TTGAAGTCGCAGGAGACAACCT-3' (配列番号:24)

GAPDH-hybridization probe

5'-FAM-TGCCTGCTTCACCACCTTCTGATGT-TAMRA-3' (配列番号:25)

[0072] レーザードップラー環流像

腫瘍内血流をレーザードップラー環流像 (Laser Doppler perfusion image; LDPI) 解析機 (Moor Instruments, Devon, UK) を用いて以前の記載の通りに評価した (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res.

2002;91:723–730)。小腸の血流によるバックグランドノイズを除去するため、測定の直前にブルーシートを腹腔に挿入した。周囲の明るさおよび温度によるデータのばらつきを最小化するため、LDPIインデックスは陰嚢内のpixelに対する腫瘍内のpixelの比として表した。

[0073] 統計解析

全てのデータは平均±SEMとして表し、Fisherの補正によるone-way ANOVAで解析した。生存解析では、救肢スコア (limb salvage score) で表した生存率 (Masaki I et al., FASEB J. 2001;15:1294–1296) をKaplan–Meyer法で解析した。生存実験の統計的有意性はlog rank testで決定し、P<0.05を統計的有意とした。

[0074] [実施例1]

本実施例では、FGF-2およびPDGF-AAは、FGF-2が媒介するPDGFR α のアップレギュレーションを介して協同的にVEGFおよびHGF/SF発現を亢進することを示す。宿主血管系の血管新生応答におけるPDGF-AAシグナルの役割を評価するため、血清フリーの条件で培養したヒト間葉系細胞 (MRC5およびHSMC) におけるFGF-2を介したVEGFおよびHGFの誘導を調べた。図1Aに示すように、MRC5細胞の培養液中へのVEGF放出は、FGF-2により刺激されたが、PDGF-AAによっては刺激されなかった(図1A左)。逆に、PDGF-AAはHSMC培養液中のVEGF量をアップレギュレートしたが、FGF-2はVEGFをアップレギュレートしないことが判明した(図1A右)。一方、FGF-2およびPDGF-AAを用いた共刺激は、MRC5およびHSMCの両方の細胞型において、VEGF発現(図1A) およびHGF/SF発現(データ非提示)に関して協同的な増強効果を示すことが判明した。MRC5細胞と同様に、マウス線維芽細胞株 NIH3T3でも、VEGFおよびHGF発現に対するFGF-2とPDGF-AAの協同効果が観察された(データ非提示)ことから、このような効果は動物種によらず間葉系細胞に共通していることが示された。虚血治療等の臨床場面においても、FGF2およびPDGF-AAを投与することにより、それぞれを単独で投与するよりも高い効果で血管新生を誘導することが可能と考えられる。ノーザンプロット解析により、MRC5およびHSMCの両方の細胞型においてFGF-2を介したPDGFR α 転写のアップレギュレーションが示されたが(図1B)、PDGF-AAはFGFR1の発現は変化させなかった(データ非提示)。これ

らの知見は、FGF-2は、間葉系細胞におけるVEGFおよびHGF/SFの発現を調節するPDGF-AAの応答を、PDGFR α の転写調節を介して調節していることを示唆している。

[0075] [実施例2]

本実施例では、間葉系細胞におけるFGF-2依存的VEGFおよびHGF/SF発現はPDGFR α により媒介され、PDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の阻害によりシャットダウンされることを示す。

MCにおけるVEGFおよびHGF/SF発現に及ぼすFGF-2およびPDGF-AAの協同的効果に加え、本発明者らは、以前、FGF-2は、HSMCにおけるHGF/SFの持続発現に寄与するRasおよびp70S6Kシグナル伝達を介して、PDGF-AAの内在発現を上昇させることを見出した (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。本発明者らは、線維芽細胞 (MRC5細胞) においても、VEGFおよびHGF/SF発現において類似した系が見られると予想した。以前の研究で観察されたように、FGF-2は典型的にVEGFおよびHGF/SF蛋白質をアップレギュレートし、これらの効果はMEK阻害剤、Ras-inhibitory peptide、およびp70S6Kインヒビター (RAPA) によって失われた (図2A)。MRC5細胞におけるFGF-2を介したVEGF発現の時間経過の繰り返しノーザンプロット解析では、HSMCを用いたHGF/SF発現の場合で以前みられたのと同様に (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)、bi-phasic (3時間目とそれより後) なVEGFのアップレギュレーションが起こることが判明した (図2B)。初期の方のVEGF発現はRAPA処理により影響されないが、後期の持続的発現はRAPA処理により完全に消滅した (図2B)。さらに、FGF-2を介したVEGF蛋白質のアップレギュレーションは、抗PDGFR α 抗体により完全になくなり (図2C)、RAPAで観察されたのと同様であった (図2A)。HGF/SF発現についても同じ結果が得られたことから (データ非提示)、MCにおいてPDGFR α 系は、FGF-2を介したVEGFおよびHGF/SF発現の増強および持続に必須の役割を果たしていると結論された。

[0076] [実施例3]

本実施例では、PDGFR α は、マウス重症肢虚血におけるFGF-2の治療効果に必須の役割を果たすことを示す。

インビボにおけるFGF-2-PDGFR α -VEGF/HGFの予想されるカスケード様の関連を調べるため、FGF-2を発現する組み換えセンダイウイルス (SeV-FGF2) をインビボで用いて、2つの別々のマウス肢虚血モデル、すなわちC57BL/6マウスの救肢モデル (limb salvage model) および balb/c nu/nu マウスの肢脱落モデル (autoamputation model) (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973) を評価した (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730; Compagni A et al., Cancer Res. 2000;60:7163-7169; Yonemitsu Y et al., Nat Biotechnol. 2000;18:970-973; Masaki I et al., FASEB J. 2001;15:1294-1296; Yamashita A et al., J Immunol. 2002;168:450-457; Shoji F et al., Gene Ther. 2003;10:213-218)。救肢モデルでは、ELISAによるアッセイでFGF-2の過剰発現が確認されたが (データ非提示)、リアルタイムPCRによる定量アッセイではPDGF-AおよびPDGFR α の両mRNAのアップレギュレーションが確認された (図3AおよびB)。同じ組織サンプルにおいて、FGF-2によりVEGFおよびHGF/SF発現も同様に増強することが観察され、その効果は抗PDGF-AA中和抗体により消滅し、またRAPA処理によつても消滅した (図3CおよびD)。RAPAのこの効果は蛋白質レベルでも確認された (図3EおよびF)。また、肢脱落モデルにおけるFGF-2の治療効果は抗PDGF-AA抗体およびRAPAにより失われた (図4) ことから、PDGFR α 系はFGF-2を介した治療的な血管新生においても必須の役割を果たしていることが示された。

[0077] [実施例4]

本実施例では、PDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の阻害は、各腫瘍型における血管新生因子群の発現の多様性とは無関係に腫瘍休眠 (tumor dormancy) を誘導することを示す。

腫瘍フリー系での結果は、MCにおけるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路は血管新生に必須であり、RAPAはFGF-2を介した血管新生における抗PDGF-AA抗体の効果を模倣することを示唆する。しかしながら、ユビキタスな血管新生反応における血管新生刺激とは無関係にRAPAが作用できるのかについては疑問がある。これを明らかにするため、2つの別々の腫瘍細胞株を用いて腫瘍血管新生の試験を行った。腫瘍細胞株としては、VEGF、FGF-2、およびPDGF-AAを高レベルで発現するヒト

口腔扁平上皮細胞癌であるSAS、およびSASに比べVEGFおよびFGF-2の分泌がはるかに低く、PDGF-AAの発現は見られないマウス肝細胞癌であるMH134を用いた。

[0078] 図5A～Dに示すように、RAPAはSASおよびMH134両方の腫瘍型の増殖を抑制したことから、RAPAの抗腫瘍効果は各腫瘍型の血管新生増殖因子の発現パターンとは無関係であることが示唆された。PDGFR α -p70S6K経路における抗腫瘍効果が腫瘍型に依存しないことを示す証拠をさらに得るために、ヒトPDGFR α 可溶型を発現するSeV-hsPDGFR α を腫瘍内注射し、腫瘍の増殖をアッセイする実験を行った。期待したように、SeV-hsPDGFR α は両腫瘍型の増殖を有意に阻害した(図5E～F)。実験の終了時に腫瘍重量を測定したところ、ルシフェラーゼを発現するSeVベクターを投与したコントロールに比べ、SeV-hsPDGFR α を投与した腫瘍重量は両腫瘍型とも有意に減少していた(SAS-luciferase: 415.1 ± 104.9 mg vs. SAS-hsPDGFR α 54.3 ± 9.6 mg, MH134-luciferase: $3,930.4 \pm 304.4$ mg vs. MH134-hsPDGFR α $2,654.4 \pm 296.5$ mg, それぞれ P=0.0027 および P=0.0106、平均±S.E.)。

[0079] RAPA処理では内皮の直接的増殖阻害(Vinals F et al., J Biol Chem. 1999;274:26776–26782; Yu Y et al., J Cell Physiol. 1999;178:235–246)などの、p70S6K阻害とは別の抗腫瘍作用があることを考慮すると、SeV-hsPDGFR α によるPDGFR α -p70S6K経路の阻害作用は非常に高く、複数回投与を行なえば、より効果的に腫瘍増殖を抑制することが可能と考えられる。

[0080] PDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の阻害による抗腫瘍効果が血管新生因子の発現パターンによらないことを確かめるため、インビオおよびインビトロにおいて、RAPAの存在下および非存在下におけるVEGFの発現を調べた。培養系においては、100 ng/mlのRAPAはSASの内因的VEGF分泌量を基底状態の約30から50%に有意に減少させた。調べた他の腫瘍(口腔扁平上皮細胞癌: QG56、TF、KN、EBC-1、および腺癌: PC9)でも、normoxiaの条件で基底状態からの同様の減少が見られた。同様の知見は他のグループからも報告されている(Guba M et al., Nat Med. 2002;8:128–135)。また、各腫瘍型においてPDGF-AAおよびFGF-2発現に対するRAPAの影響は観察されなかった(データ非提示)。しかしながら、MH134腫瘍のインビオ評価においては、RAPA処理して3日または7日後の腫瘍内でのVEGF発現は、

バッファーで処理したコントロールと比べ有意に上昇した(図6A)。さらに、両方の腫瘍において、RAPA注入の開始から7日後の血流が減少していることが、ドップラー環流像解析により判明した(図6B)。

- [0081] これらの結果は以下のように説明し得る。RAPA処置は低酸素症(hypoxia)を誘導し、その結果、hypoxiaに依存した機構を介してVEGFがアップレギュレートされ、RAPAを介したダウンレギュレーションが相殺された。この機構は、以下のようにして確認された。培養MH134におけるhypoxia(2.5% O₂)が誘導するVEGF発現に対して、RAPAは、有意ではあるが、最小限の効果しか示さない(図6C)。同様の結果が、調べた全ての細胞株で得られた(データ非提示)。
- [0082] そこで、SASのxenograftモデルにおいて、ヒトおよびマウス特異的ELISA系を用いてVEGFの起源を調べた。固形癌において、RAPAはマウスVEGF量には影響せず、ヒトVEGFを有意に上昇させたことから(図6D)、腫瘍細胞由来のVEGFの上昇は、各腫瘍型の血管新生因子の発現の多様性によらず、宿主血管系を標的とする血管新生によるhypoxiaに媒介されることが示された。
- [0083] [実施例5]

本実施例では、PDGF-Aの発現の阻害による腫瘍増殖の抑制を例示する。

ヒトPDGF-A遺伝子のクローニングを以下のように行った。MRC5細胞 mRNAより逆転写(Isogen, Oligo dT primerを使用)したcDNAを用い、フォワードプライマー AAGAATTCATGAGGACCTTGGCTTGCCTGC(配列番号:26)、リバースプライマーAAGAATTCTTAGGTGGGTTAACCTTTCTTT(配列番号:27)を用いてPCRを行った(下線部はEcoRI部位)。96°C5分の後、96°C30秒–60°C45秒–72°C45秒を35サイクル行い、72°C5分を行った。PCR産物(636 bp)をTAクローニングベクターpCR II(登録商標, Invitrogen)にサブクローニングした。配列をシークエンシングにより確認後、制限酵素EcoRIにて切り出し、発現ベクターpcDNA 3.1(+)(登録商標, Invitrogen)へサブクローニングした。制限酵素SacIで切断して方向性を確認し、アンチセンス遺伝子を同定した(pcDNA3-asPDGFA)。

- [0084] 外来的に導入したVEGF遺伝子の発現に対するPDGF-Aの発現の有無の影響を調べるため、NIH3T3細胞にヒトVEGF165発現プラスミドベクター

(pcDNA3-hVEGF165) とアンチセンスヒトPDGF-A発現ベクター (pcDNA3-asPDGFA) を同時に遺伝子導入した。コントロールとして、空ベクター (pcDNA 3.1) またはヒトVEGF165発現プラスミドベクター (pcDNA3-hVEGF165) を単独で導入した細胞を作製しVEGFレベルを比較した。その結果、空ベクター (pcDNA 3.1) 導入細胞からのVEGF発現は検出されず、pcDNA3-hVEGF165単独を導入した細胞からのVEGFレベルは 2.42 ± 0.73 (平均±S.E.) pg/ μ g protein、pcDNA3-hVEGF165およびpcDNA3-asPDGFAを共導入した細胞からのVEGFレベルは 2.27 ± 0.57 pg/ μ g protein であり、VEGF165レベルは、pcDNA3-asPDGFAの導入の有無により有意な影響を受けず、PDGF-Aのアンチセンスによる外来VEGF発現への干渉は見られないことが判明した(図7)。

- [0085] ヒト扁平上皮癌、腺癌に対し、アンチセンスヒトPDGF-A発現ベクター (pcDNA3-asPDGFA) を遺伝子導入し、安定形質転換細胞株の作製を行った。具体的には、腫瘍細胞株 (SAS, TF, QG56, A549) ～Lipofectamine (登録商標, Life Technologies) にてpcDNA3-asPDGFAをトランスフェクション後、G418 500 μ g/ml (Promega) にて培養し、形質転換細胞株を得た。これらの細胞を96 well plateにてsingle cell cultureを行い、ELISAにてPDGF-A発現抑制の強いコロニーを選択した。同過程を3回繰り返し行った。得られた腫瘍細胞 5×10^5 個を6 well plateに撒き、一晩培養し、血清不含RPMI 1640 培地にて2回washし、血清不含RPMI 1640 培地 1ml にて24時間インキュベートした。その後細胞を回収し、PDGF-AA ELISA kit (R&D) にてPDGF-AAの発現レベルを定量した。同様に、培養液中に分泌されたVEGFを、ELISAにて定量した。コントロールとして空ベクターを導入した腫瘍細胞を作製した。
- [0086] 図8(A) は、各種癌細胞におけるPDGFR α の発現をRT-PCRにより測定した結果を示す。対象とした腫瘍細胞全てにPDGFR α が発現していることが判明した。これらの癌細胞にアンチセンスヒトPDGF-A発現ベクターを導入したところ、全ての腫瘍細胞において、PDGF-AAの発現レベルを有意に低下させると同時に、VEGFの発現レベルも低下させることが判明した(図8(B)～(E))。
- [0087] 次に、PDGF-Aの発現を阻害した癌細胞について、腫瘍移植アッセイにより腫瘍の増殖性の変化を調べた。上記で作製した形質転換腫瘍細胞 1×10^6 個を、Balb/c

nudeマウス(5週齢、雄)の側腹部へ皮下注射した。以降、腫瘍サイズの計測を週3回行った。腫瘍容積は、 $\pi / 6 * a * b * c$ にて計算した(a, b, およびc は腫瘍の横径、縦径、および幅を表す)。図9に示すように、PDGF-Aアンチセンスを発現させた全ての腫瘍細胞において、腫瘍増殖の明らかな低下を認めた。なお in vitroでは、これらの細胞の増殖能に有意差はなかった。

- [0088] ヒト肺癌手術新鮮標本における、PDGF-AとVEGFのmRNA発現の相関をリアルタイムPCRにより調べた。具体的には、ヒト肺癌組織・正常組織よりmRNAを逆転写および精製してcDNAを調製し (Isogen, Oligo dT primerを使用)、ABI 7000を用いてリアルタイムPCRによりPDGF-A mRNAを定量した。フォワードプライマーとして TCCACGCCACTAAGCATGTG (配列番号:28)、リバースプライマーとして TCGACCTGACTCCGAGGAAT (配列番号:29)、Taqmanプローブ (FAM、TAMRA) として CTGCAAGACCAGGACGGTCATTACGA (配列番号:30) を用いた。50°C 2 分の後、96°C 10分を行い、95°C 15秒–60°C 1分を40サイクル行った。結果、癌部および非癌部とともに、PDGF-A発現とVEGF発現は有意に相関することが判明した(図10)。これは、PDGF-AのオートクライインによるVEGF発現誘導システムが、正常組織のみならず、癌においても成立していることを示唆する。
- [0089] また、ヒト肺癌切除標本におけるPDGF-AA陽性率と患者予後の相関を調べた。ヒト肺癌切除標本におけるPDGF-AA発現を免疫組織化学染色により調べるため、ヒト肺癌組織切片を脱パラフィンし、PBSにて3回洗浄した。3% スキムミルクにて30分間ブロッキングを行い、1次抗体 (抗ヒトPDGF-AA抗体、60倍希釈、R&D) にて4°Cで一晩反応させた。PBSで3回洗浄後、2次抗体 (ヒストファインシンプルスティン MAX PO(G)、Nichirei Corp.) にて室温、30分反応させ、DABにて発色させた。図11に示すように、PDGF-AA陽性肺癌患者の予後は、陰性患者のそれと比較して有意に低かった。これらの結果から、PDGF-Aの発現レベルの検査により、腫瘍の悪性度、患者予後を予測することが可能である。すなわち、腫瘍におけるPDGF-Aの発現を測定し、PDGF-Aの発現が検出された場合に、発現が陰性の腫瘍に比べ悪性であり、予後が不良と判断される。また、この結果はPDGF-Aの発現および/または活性の阻害が、PDGF-A陽性癌に対する抗腫瘍治療に有効であることを示している。

産業上の利用可能性

[0090] 本発明により、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害することを通して腫瘍増殖を抑制する方法が提供された。PDGF-AAによるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の活性化は、腫瘍血管形成の重要なファクターであり腫瘍を患う患者の予後と関連している。腫瘍またはその周辺組織におけるPDGF-Aの発現を阻害することによって、あるいはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害することによって、腫瘍血管形成は阻害され、腫瘍の増殖を抑制することができる。

請求の範囲

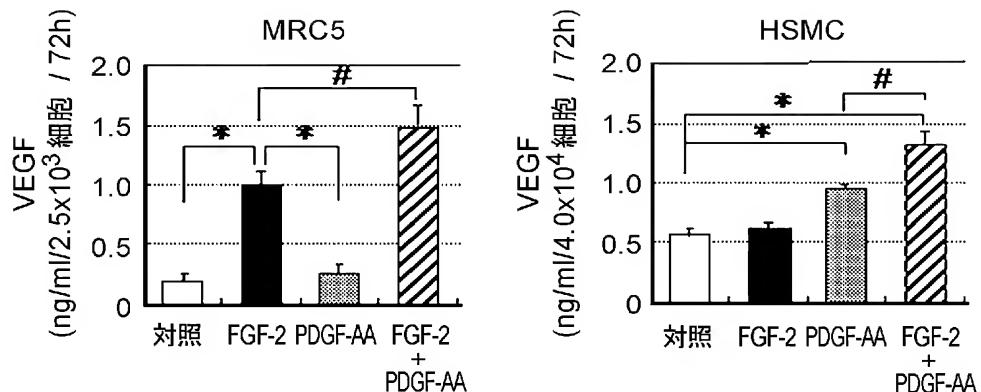
- [1] PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する工程を含む、腫瘍の増殖を抑制する方法。
- [2] 該工程が、PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質をコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを腫瘍に投与する工程である、請求項1に記載の方法。
- [3] 該ベクターが投与された細胞を投与する、請求項2に記載の方法。
- [4] 細胞が樹状細胞である、請求項3に記載の方法。
- [5] 該分泌性蛋白質が可溶性PDGFR α である、請求項2に記載の方法。
- [6] マイナス鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項2に記載の方法。
- [7] 該工程が、PDGF-A遺伝子のアンチセンスRNA、siRNA、あるいは該アンチセンスRNAまたはsiRNAをコードするベクターを腫瘍に投与する工程である、請求項1に記載の方法。
- [8] 腫瘍が扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、および腺癌からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。
- [9] PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する化合物を有効成分として含む抗腫瘍剤。
- [10] 下記(a)から(d)のいずれかを含む、請求項9に記載の抗腫瘍剤。
 - (a) PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質。
 - (b) PDGF-A遺伝子またはPDGFR α 遺伝子のアンチセンスRNA。
 - (c) PDGF-A遺伝子またはPDGFR α 遺伝子のsiRNA。
 - (d) (a)から(c)のいずれかをコードするベクター。
- [11] PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質をコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを含む、請求項10に記載の抗腫瘍剤。
- [12] 該分泌性蛋白質が可溶性PDGFR α である、請求項10または11に記載の抗腫瘍剤。
- [13] マイナス鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項11に記

載の抗腫瘍剤。

- [14] PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質をコードするベクターが導入された細胞を含む、請求項10に記載の抗腫瘍剤。
- [15] 細胞が樹状細胞である、請求項14に記載の抗腫瘍剤。
- [16] PDGF-A遺伝子のアンチセンスRNA、siRNA、あるいは該アンチセンスRNAまたはsiRNAをコードするベクターを有効成分として含む、請求項10に記載の抗腫瘍剤。
- [17] 腫瘍が扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、および腺癌からなる群より選択される、請求項9に記載の抗腫瘍剤。

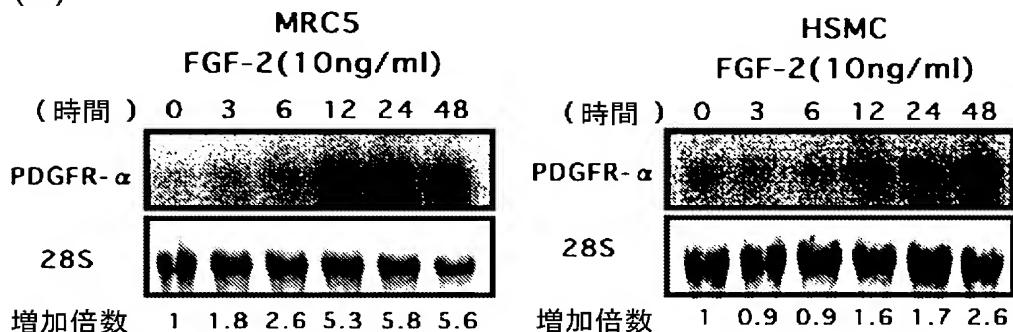
[図1]

(A)



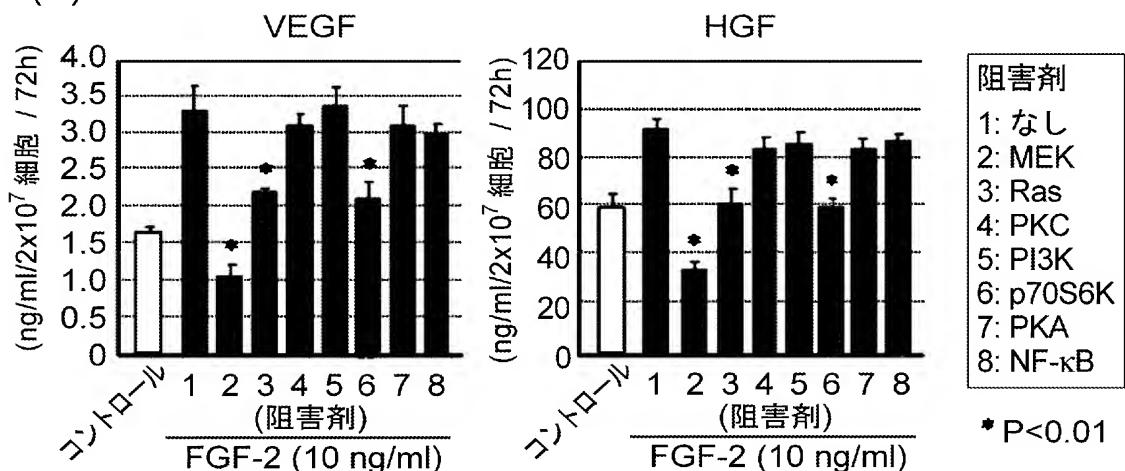
* P<0.01, #P<0.05

(B)

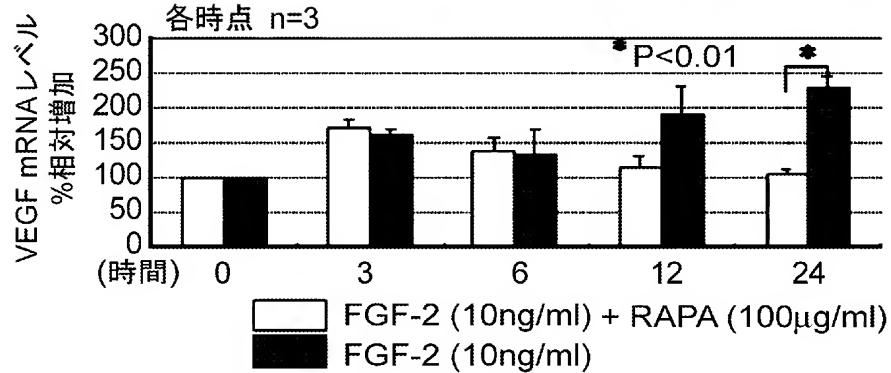
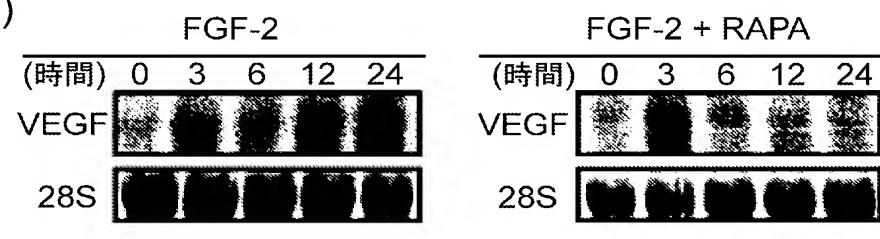


[図2]

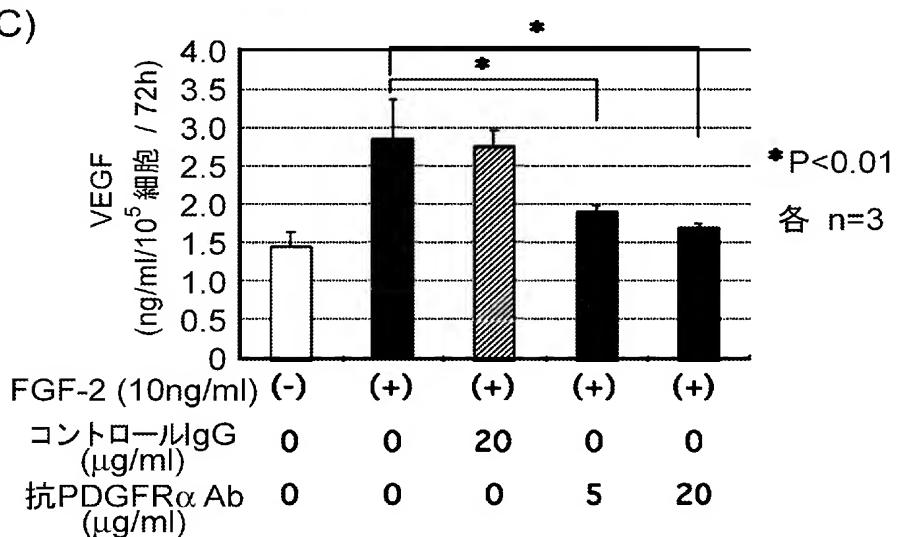
(A)



(B)

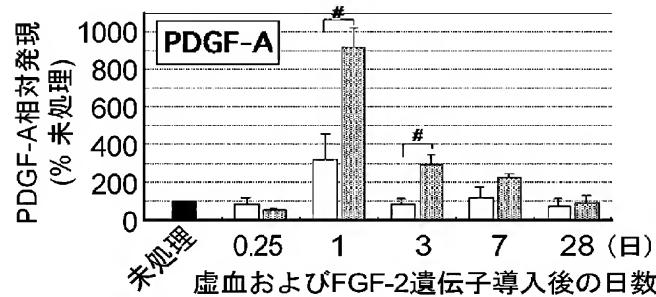


(C)

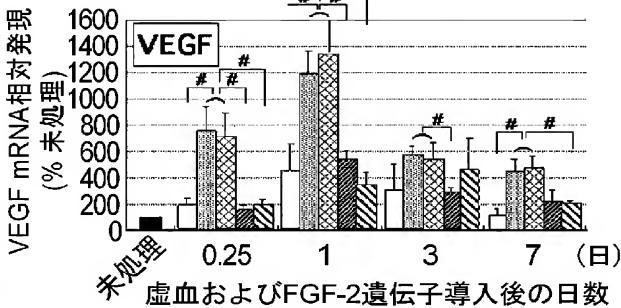


[図3]

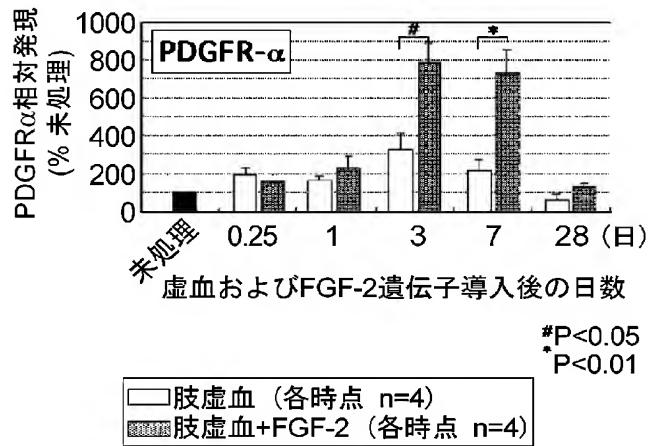
(A)



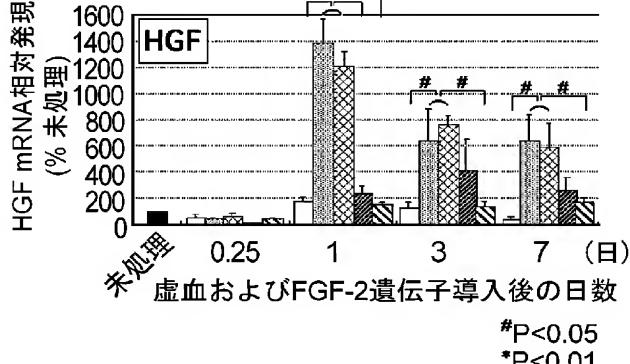
(C)



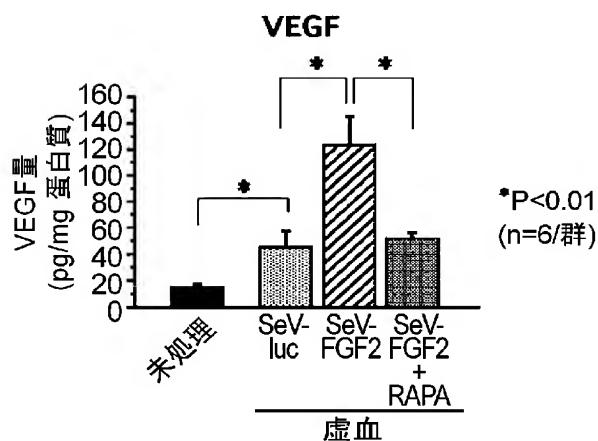
(B)



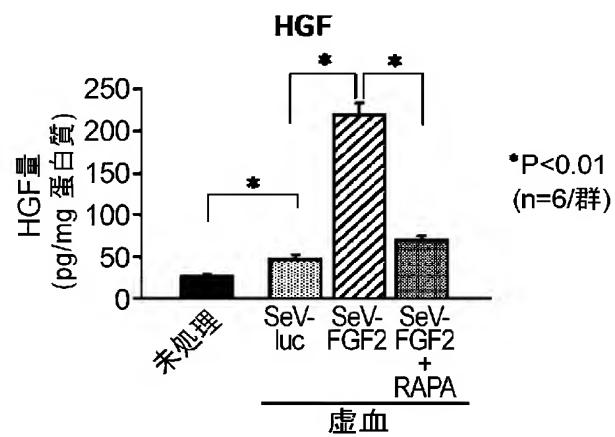
(D)



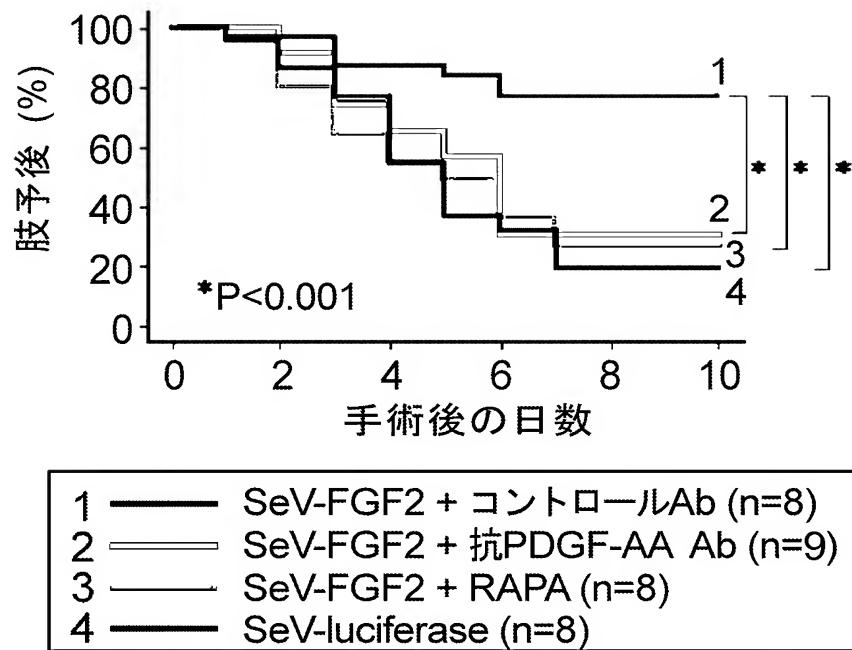
(E)



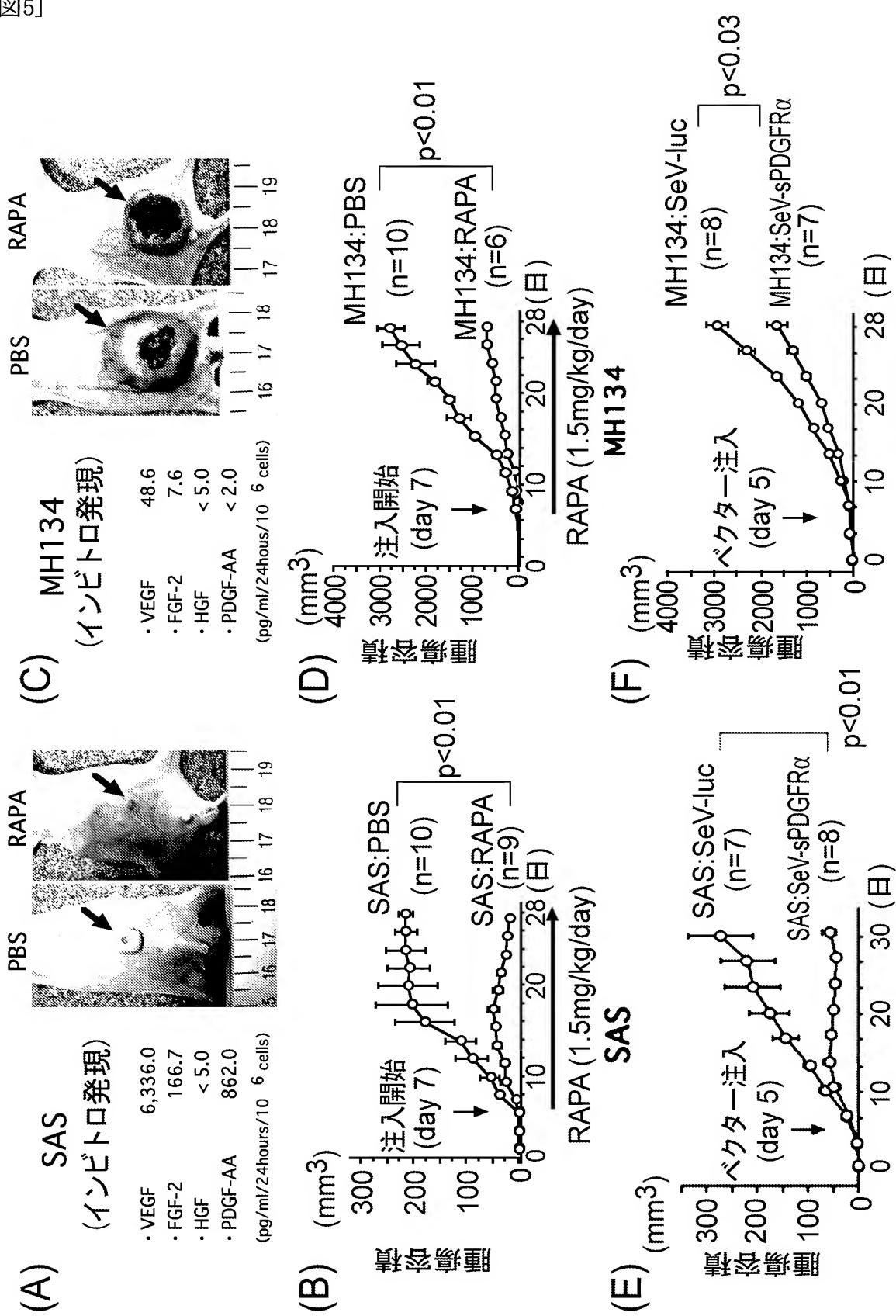
(F)



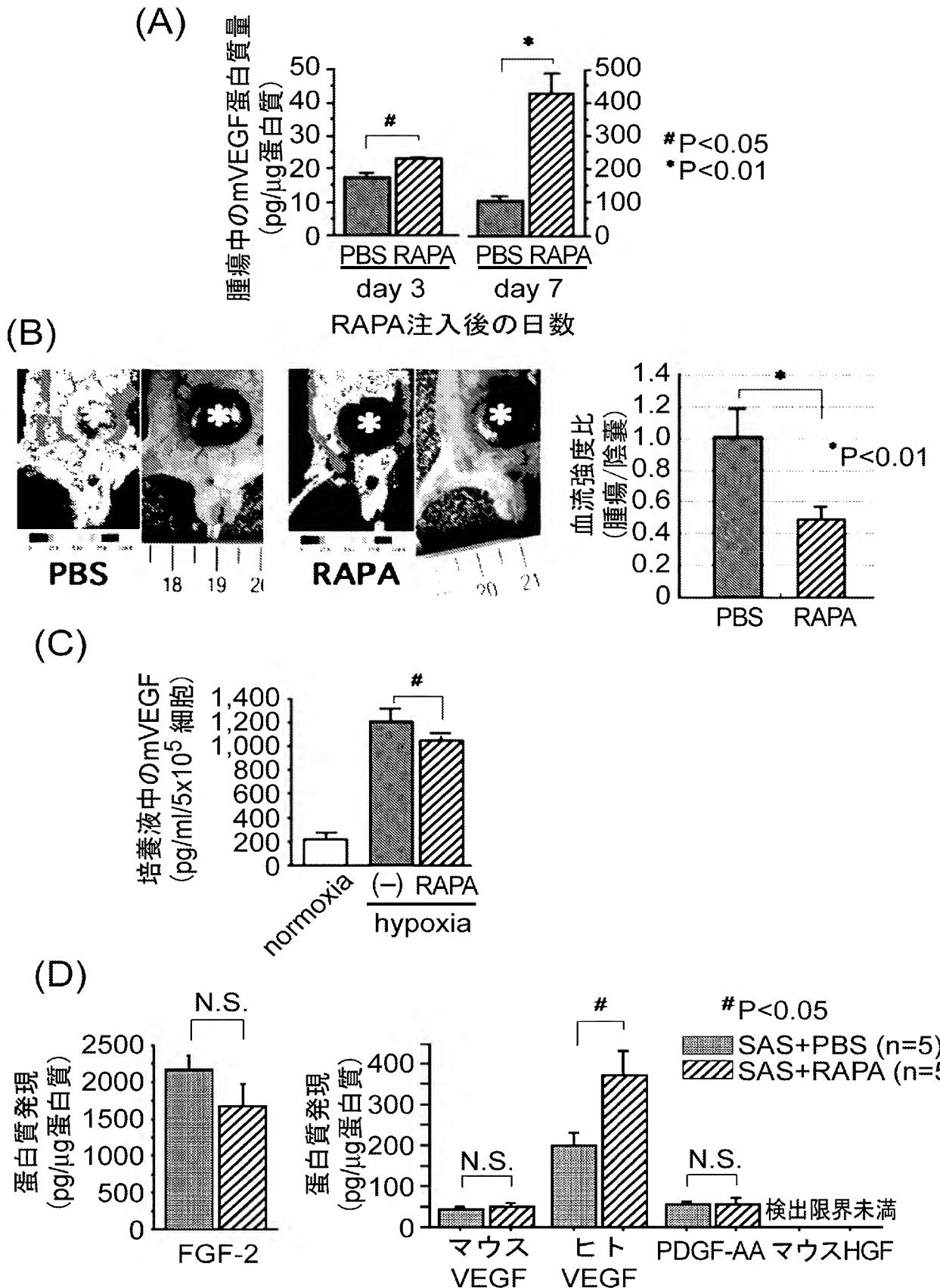
[図4]



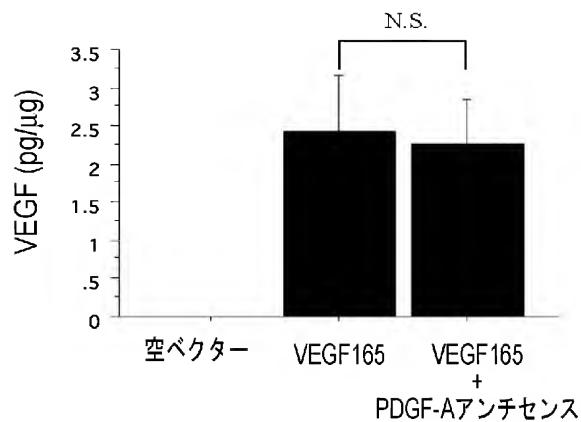
[図5]



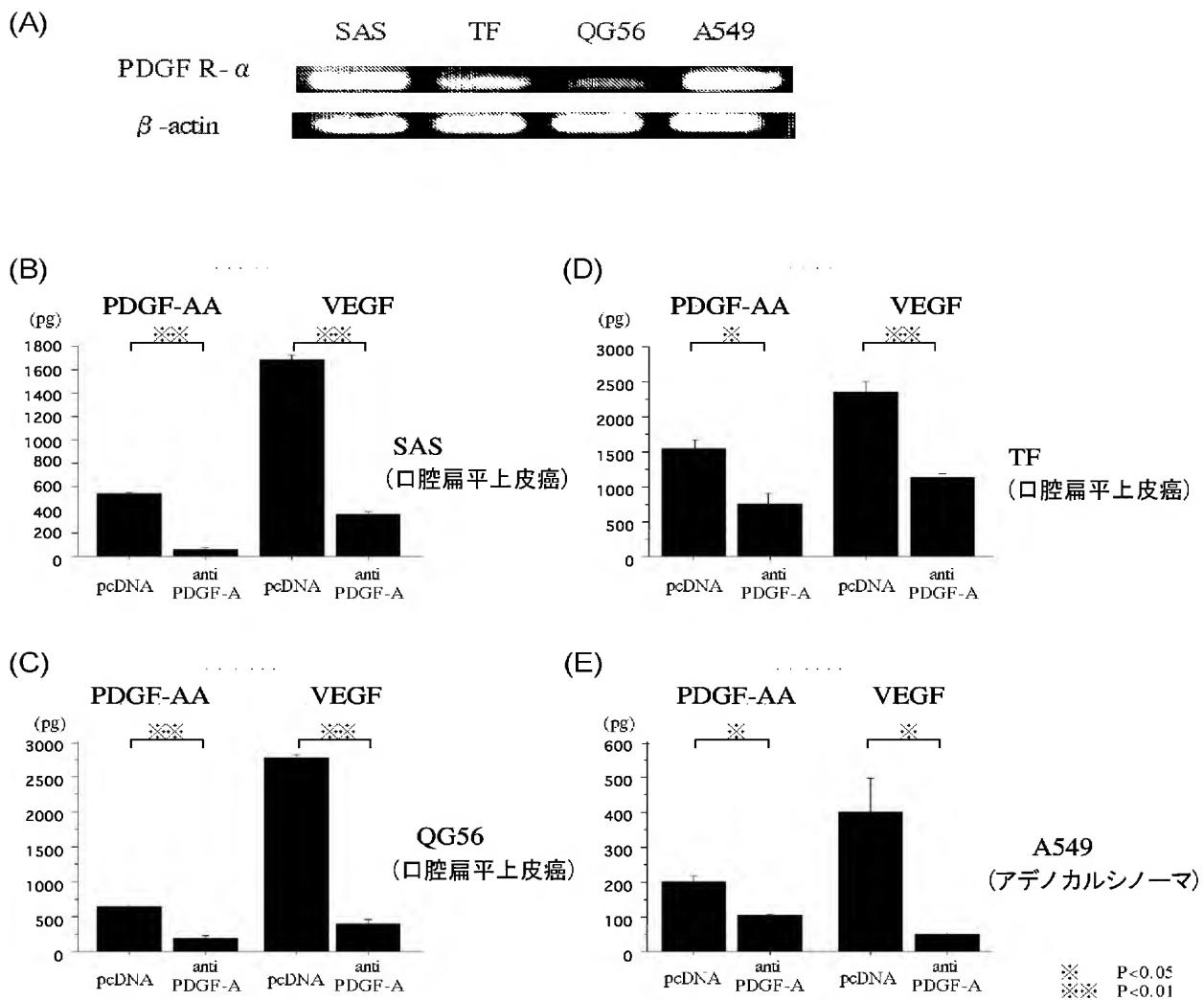
[図6]



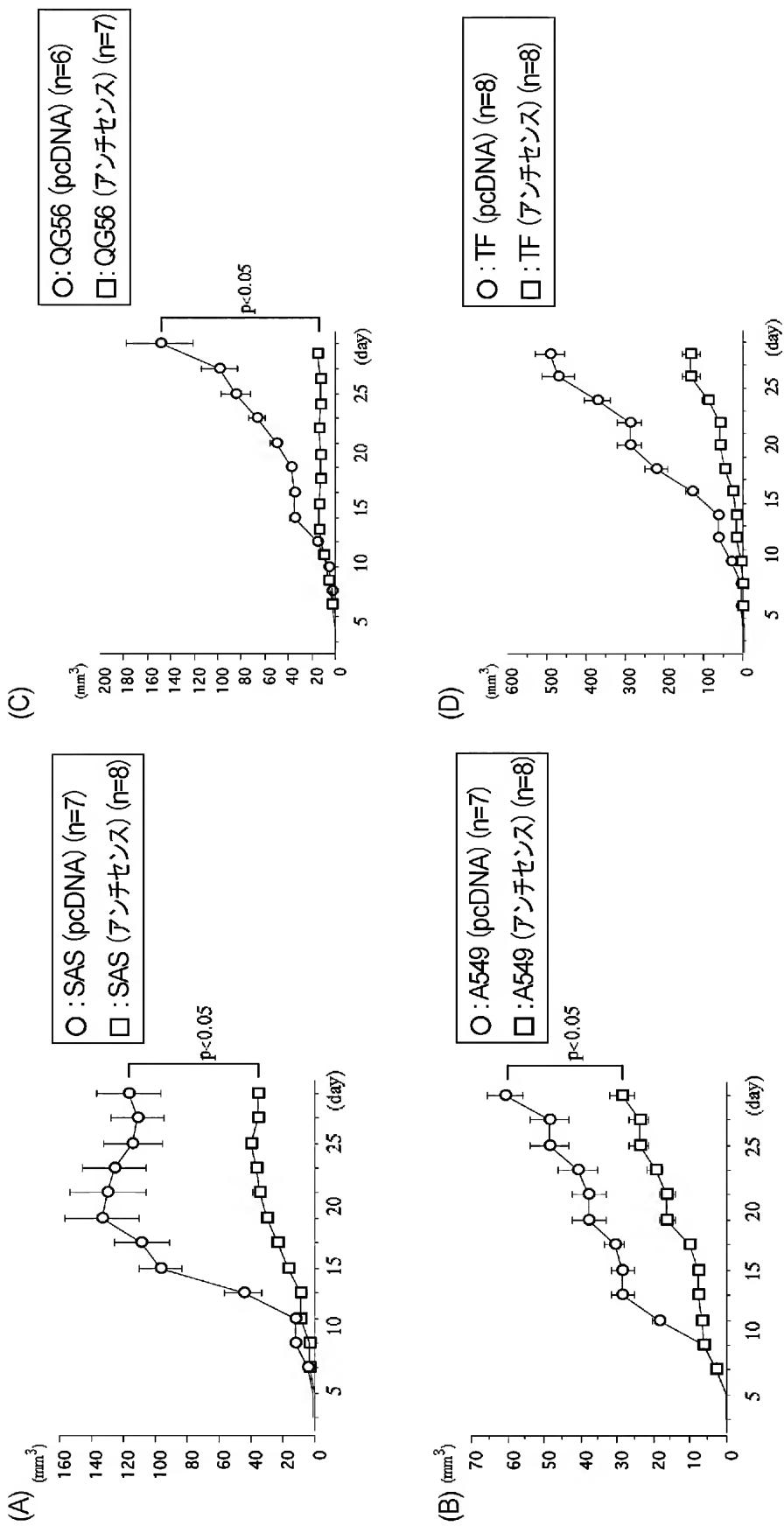
[図7]



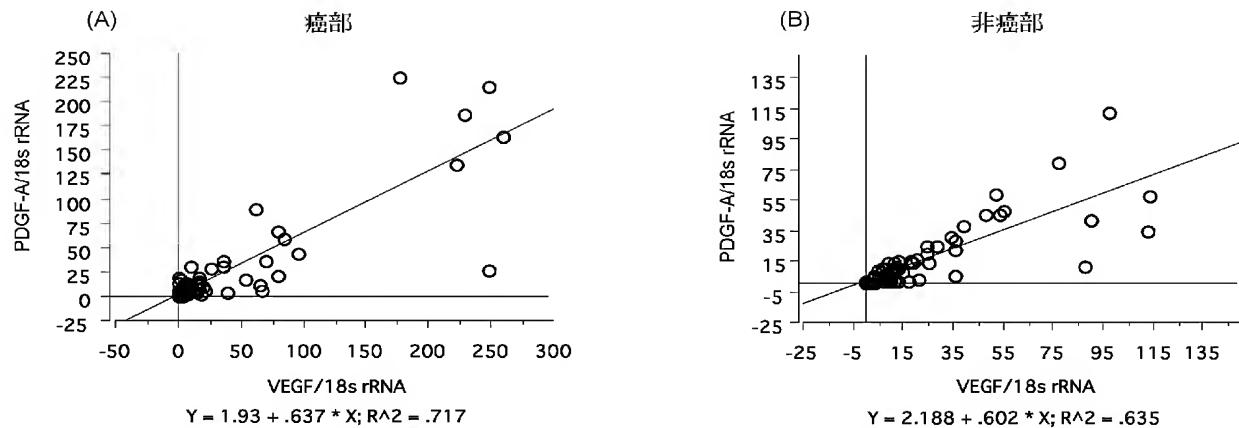
[図8]



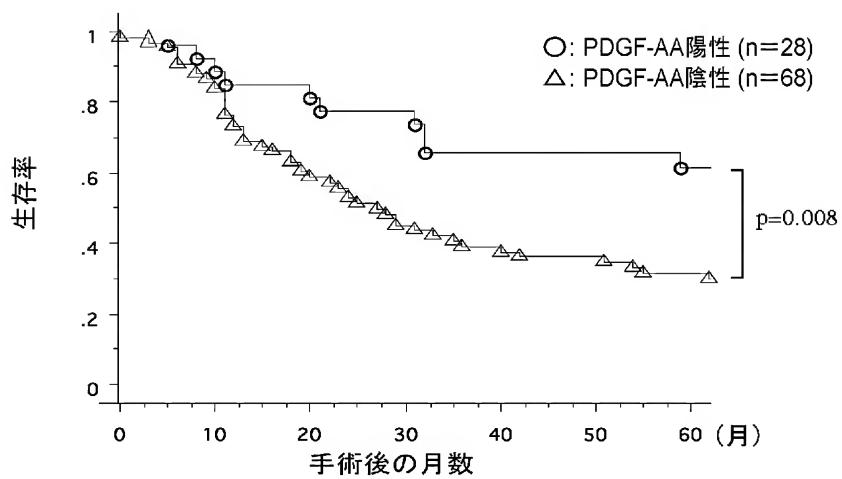
[図9]



[図10]



[図11]



紙面による写し(注意 提出用では有りません)

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願に關し、 株式会社ディナベック研究所 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2004年 03月 15日 (15. 03. 2004)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	日本外科学会
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	第104回日本外科学会定期学術集会抄録集
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁷ A61K45/00, 31/7105, 35/76, 48/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ A61K45/00, 31/7105, 35/76, 48/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	BEHL C. et al., Autoinduction of platelet derived growth factor (PDGF) A-chain mRNA expression in a human malignant melanoma cell line and growth inhibitory effects of PDGF-A-chain mRNA-specific antisense molecules., Biochemical and biophysical research communications, 15 June, 1993 (15.06.93), Vol.193, No.2, p.744-51	9, 10, 17 11-16
X Y	WO 1995/16032 A1 (BIOGNOSTIK GESELLSCHAFT FUR BIOMOLEKULARE DIAGNOSTIK MBH), 15 June, 1995 (15.06.95), Particularly, Claims & US 5698094 A	9, 10, 17 11-16

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
09 June, 2005 (09.06.05)Date of mailing of the international search report
28 June, 2005 (28.06.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004485

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIEGFRIED, Geraldine et al., The Proteolytic Processing of Pro-Platelet-derived Growth Factor-A at RRKR86 by Members of the Proprotein Convertase Family Is Functionally Correlated to Platelet-derived Growth Factor-A-induced Functions and Tumorigenicity, Cancer Research, 2003, Vol.63, No.7, pages 1458 to 1463	9,17
Y	Tiesman J. et al., Identification of a Soluble Receptor for Platelet-derived Growth Factor in Cell-conditioned Medium and Human Plasma, Journal of Biological Chemistry, 1993, Vol.268, No.13, pages 9621 to 9628	10-14,16
Y	WO 2003/072704 A2 (RIBOZYME PHARMACEUTICALS, INC.), 04 September, 2003 (04.09.03), Particularly, Claims; examples & EP 1476458 A1 & AU 9851819 A1 & AU 9939188 A1	10,16
Y	WO 2003/029475 A1 (DNAVEC Research Inc.), 10 April, 2003 (10.04.03), Particularly, Claims & EP 1447451 A1 & US 2004/265272 A1 & CA 2462259 A	11-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2005/004485**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1 - 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 to 8 pertain to [methods for treatment of the human body by therapy] and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 31/7105, 35/76, 48/00, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 31/7105, 35/76, 48/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS(STN), CAPLUS(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	BEHL C et al., Autoinduction of platelet derived growth factor (PDGF) A-chain mRNA expression in a human malignant melanoma cell line and growth inhibitory effects of PDGF-A-chain mRNA-specific antisense molecules. , Biochemical and biophysical research communications, 1993 Jun 15, VOL. 193, No. 2, p. 744-51	9, 10, 17
Y		11-16
X	WO 1995/16032 A1 (BIOGNOSTIK GESELLSCHAFT FUR BIOMOLEKULARE DIAGNOSTIK MBH), 1995. 06. 15, 特に、特許請求の範囲 & US 5698094 A	9, 10, 17
Y		11-16

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.06.2005

国際調査報告の発送日

28.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

4C 9454

上條 のぶよ

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SIEGFRIED, Geraldine et al., The Proteolytic Processing of Pro-Platelet-derived Growth Factor-A at RRKR86 by Members of the Proprotein Convertase Family Is Functionally Correlated to Platelet-derived Growth Factor-A-induced Functions and Tumorigenicity, Cancer Research, 2003, Vol. 63, No. 7, p. 1458-1463	9, 17
Y	Tiesman J. et al., Identification of a Soluble Receptor for Platelet-derived Growth Factor in Cell-conditioned Medium and Human Plasma, Journal of Biological Chemistry, 1993, Vol. 268, No. 13, p. 9621-9628	10-14, 16
Y	WO 2003/072704 A2 (RIBOZYME PHARMACEUTICALS, INC.), 2003. 09. 04, 特に、特許請求の範囲及び実施例 & EP 1476458 A1 & AU 9851819 A1 & AU 9939188 A1	10, 16
Y	WO 2003/029475 A1 (株式会社ディナベック研究所), 2003. 04. 10, 特に、特許請求の範囲 & EP 1447451 A1 & US 2004/265272 A1 & CA 2462259 A	11-15

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 1 - 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲1-8は【治療による人体の処置方法に関するもの】であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。